4-IMIDAZOLIDINONE

AUS PEPTIDEN UND CARBONYLVERBINDUNGEN

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

François Joseph Cardinaux

aus Châtel-St.Denis (FR)

1972

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546022_0005

4-IMIDAZOLIDINONE

AUS PEPTIDEN UND CARBONYLVERBINDUNGEN

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

François Joseph Cardinaux

aus Châtel-St.Denis (FR)

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren:

UNIV. LEIDEN BIBL.

Prof. Dr. C. Grob

Prof. Dr. M. Brenner

Basel, den 8. Juni 1971

Prof. Dr. H.P. Laubscher
Dekan

VORWORT

Während der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation am Institut für Organische Chemie der Universität Basel, durfte ich mancherlei Hilfe in Anspruch nehmen; ich möchte meinen Dank dafür vorausschicken.

Besonders verpflichtet fühle ich mich Herrn Prof. M. Brenner für die Wahl des Themas und für die aufmerksame Betreuung, welche er mir zuteil werden liess. Seine freundschaftlichen Ermutigungen, wie auch seine stets sachliche und konstruktive Kritik, waren für mich eine wirkliche Unterstützung bei der Ueberwindung zahlreicher Schwierigkeiten.

Als sehr wertvoll erwies sich die Zusammenarbeit mit der Peptidgruppe der CIBA AG, Basel (Leitung Dr. W. Rittel); oft durfte ich von der grossen Erfahrung ihrer Mitarbeiter Nutzen ziehen. Herrn Dr. B. Riniker und Herrn P. Sieber danke ich für die Ueberlassung verschiedener Peptide. Wichtige Daten verdanke ich Herrn Dr. H. Fuhrer (NMR-Spektren) und Herrn Dr. H. Hürzeler (Massenspektren) von der physikalischen Abteilung der CIBA AG. Letzterem bin ich für seine Mitwirkung bei der Interpretation der Spektren, und für die Diskussion der Resultate sehr verbunden.

Zum Schluss danke ich herzlich den Mitarbeitern von Prof. M. Brenner und den Angestellten des Organisch-chemischen Instituts der Universität, auf deren Hilfe ich mich stets verlassen konnte.

Basel, Mai 1971 Francis Cardinaux

INHALTSVERZEICHNIS

	Verzeichnis der Abkürzungen	1
	Einleitung	3
1.	Entstehung der 4-Imidazolidinonderivate aus Peptiden	5
1.1	Empirische Reaktionsbedingungen	5
1.1.1	Hydrogenolyse von Benzyloxycarbonyl-Peptiden	5
1.1.2	Einwirkung von Pd-Kohle, NEt_3, Alkoholen und O_2 auf ungeschützte Peptidester	6
1.1.3	Lagerung amorpher Peptidester und ihrer Acetate	9
1.2	Entstehung der Carbonylkomponenten	10
1.2.1	Oxidation von Alkoholen durch O_2 unter dem Einfluss von Pd	10
1.2.2	Oxidation von NEt_3 unter dem Einfluss von Pd	12
1.3	Nebenreaktionen am Peptid	17
1.4	Folgerungen für die präparative Peptidchemie	17
2.	Struktur der 4-Imidazolidinone aus Peptiden	19
2.1	Hypothesen	19
2.2	Instrumentalanalyse	22
2.2.1	Osmometrische MG-Bestimmung	22
2.2.2	UV-Spektren	23
2.2.3	IR-Spektren	23
2.2.4	NMR-Spektren	26
2.2.5	Massenspektren	31
2.3	Chemische Analyse	42
2.3.1	Hydrolyseverhalten	42
2.3.2	Bestimmung der Carbonylkomponente	46
2.3.3	Bestimmung der Aminosäuren	47

2.4 Strukturbeweis am Beispiel des Imidazolidinons (7) 48
2.5 Bemerkungen zur Nomenklatur 55
2.5.1 Der Heterocyclus 55
2.5.2 Der Heterocyclus in Peptidderivaten 55

3. Gezielte Synthese der 4-Imidazolidinone aus Peptiden 59
3.1 Allgemeines zur Synthese des 4-Imidazolidinonringes 59
3.2 Reaktionsmöglichkeiten zwischen Aminosäurederivaten und Carbonylverbindungen 64
3.2.1 Reaktionstypen 64
3.2.2 Beispiele an Aminosäurederivaten 67
- Schiff'sche Basen 67
- Enamine 68
- Kondensationen mit α-C von Aminosäuren 69
- Kondensationen mit diversen funktionellen Gruppen (ohne Amid) 70
- Kondensationen mit Amid-Gruppen 72
3.3 Rationale Synthese der 4-Imidazolidinone aus Peptiden 74
3.3.1 Einfluss von Pd-Kohle und NEt_3 auf die Kondensation mit Acetaldehyd und Acetal in verschiedenen Lösungsmitteln 74
3.3.2 Kondensation einiger Peptidester mit Acetaldehyd, Formaldehyd oder Aceton zu 4-Imidazolidinonen 77

4. 4-Imidazolidinone - ein potentielles Instrument in der Peptidchemie 84
4.1 N,N'-Alkyliden als Aminoschutzgruppe 8'

4.1.1 Basizität der 4-Imidazolidinone 84
4.1.2 Acylierungsversuche an 4-Imidazolidinonen 88
4.1.3 Peptidkupplungsversuche an 4-Imidazolidinonen 89
4.2 N,N'-Alkylidenschutzgruppe unter einigen Reaktionsbedingungen der Peptidsynthese 91
4.2.1 Verhalten beim Abspalten von Schutzgruppen 91
4.2.2 Verhalten bei Kupplungsreaktionen 92
4.2.3 Verhalten gegen Oxidationsmittel 92
4.3 N,N'-Alkyliden eine Amidschutzgruppe? 93
4.3.1 Zum Begriff einer Amidschutzgruppe 93
4.3.2 N,N'-Alkyliden als Schutzgruppe für die Peptidbindung 96
4.4 Ausblick 97

EXPERIMENTELLER TEIL

5. Allgemeines 100

6. Methoden 100
6.1 Dünnschichtchromatographie 100
6.2 Säulenchromatographie 101
6.3 Permethylierung von Peptiden zur Untersuchung im Massenspektrometer 102
6.4 Nachweis und quantitative Bestimmung der Carbonylkomponenten 103
6.4.1 Vergleich der 2,4-Dinitrophenylhydrazone 103
6.4.2 Quantitative Bestimmungen 104
- Aceton
- Acetaldehyd
- Formaldehyd

7. Synthese der terminalen N,N'-Alkylidenderivate 105

7.1 $\overset{|CHR|}{Val}$-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (3a,b) ($R=CH_3$) 106

7.2 $\overset{|CRR|}{Val}$-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (9) ($R=CH_3$) 109

7.3 $\overset{|CHR|}{Val}$-His-Pro-Phe-OMe (5a,b) ($R=CH_3$) 110

7.4 $\overset{|CHR|}{Pro}$-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (7) ($R=CH_3$) 111

7.5 $\overset{|CHH|}{Pro}$-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (8) 113

8. Versuche zur Synthese von nichtterminalen N,N'-Alkylidenderivaten 114

8.1 Versuche zur Acylierung von H-$\overset{|CHR|}{Val}$-His-Pro-Phe-OMe ($R=CH_3$) 114

8.2 Versuche zur Kupplung von Z-Val-Tyr-OH mit H-$\overset{|CHR|}{Val}$-His-Pro-Phe-OMe ($R=CH_3$) 116

9. Anhang 117

9.1 Acetaldehyd und Formaldehyd aus N_2 und MeOH resp. EtOH mit Pd-Kohle und Luftsauerstoff 117

9.2 Acylierung und Permethylierung von Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t 118

Zusammenfassung 119

Literaturverzeichnis 121

Lebenslauf

ABKÜRZUNGEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen von Aminosäuren, Peptiden und ihren Derivaten folgen den Empfehlungen der 'IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature' [76].

Zur Benennung und Abkürzung der 4-Imidazolidinonderivate aus Peptiden, vgl. Abschnitt 2.3 'Bemerkungen zur Nomenklatur' p 55.

[ ] Zahlen beziehen sich auf das Literaturverzeichnis

( ) Zahlen beziehen sich auf die im experimentellen Teil beschriebenen Peptidderivate

Ac_2O Essigsäureanhydrid

CAIE Chlorameisensäure-isobutylester

Cbo- Benzyloxycarbonyl-

CDI Carbonyldiimidazol

D Dublett

DC Dünnschichtchromatographie

DCCI Dicyclohexylcarbodiimid

Chl Chloroform

DMF N,N-Dimethylformamid

DNPH 2,4-Dinitrophenylhydrazon

EtOH Aethanol

h Stunde

ko komplex

Lg Lösung

Lgm Lösungsmittel

MeOH Methanol

MG Molekulargewicht

MS Massenspektrum

Et_3N Triäthylamin

Q	Quadruplett
S	Singulett
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Z-	Benzyloxycarbonyl
ZT	Zimmertemperatur
Vak	Vakuum

> The trouble with "Eureka!" is that the temptation to shout it is a very poor index of success in the enterprise at hand.
>
> P. Caws
> The Structure of Discovery
> Science 166, 1375 (1969)

EINLEITUNG

Bei synthetischen Arbeiten in der Angiotensin-Reihe [1] beobachtete man erstmals, dass die katalytische Hydrierung von Benzyloxycarbonyl-Peptiden, unter neutralen oder basischen Bedingungen in Alkoholen, zu Derivaten unbekannter Struktur führen konnte, welche dadurch auffielen, dass sie sich nicht mehr mit aktivierten Estern aminoacylieren liessen [1]. Ein ähnliches Verhalten zeigte später ein Benzyloxycarbonyl-Peptidester aus der Corticotropin-Sequenz [2].

Durch milde Hydrolyse bei neutralem pH konnten diese Derivate in die, bei der Hydrogenolyse erwarteten, ungeschützten Peptidester überführt werden. Weder die Derivate unbekannter Struktur, noch ihre Hydrolyseprodukte zeigten bei der quantitativen Aminosäure-Analyse Abweichungen von der Aminosäure-Zusammensetzung ihrer respektiven Benzyloxycarbonyl-Peptide.

Es erschien dringend, die Vorgänge bei der Hydrierung sowie die Struktur der unbekannten Peptidderivate abzuklären. Neben dem rein Peptid-chemischen Interesse (Schutzgruppenfuktion) stand auch ein allgemeines Problem der pharmazeutisch ausgerichteten Peptidchemie im Vordergrund. Angesichts der beschränkten Leistungsfähigkeit der Reinigungsverfahren, gilt

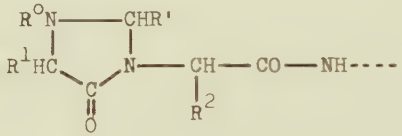
---

[1] Ausgeführt durch die Arbeitsgruppe von Schwyzer in der CIBA AG, Basel.

es die Entstehung von Nebenprodukten bei den vielen notwendigen Syntheseschritten zu verhindern, um den Anforderungen höchstmöglicher Reinheit zu genügen.

Die Untersuchungen, welche den Gegenstand der vorliegenden Dissertation bilden, brachten folgende Ergebnisse:

1. Die bei der Hydrierung angewandten Bedingungen führen zur Bildung von 4-Imidazolidinon-Derivaten:



2. Diese entstehen durch Kondensation des Peptidesters mit Acetaldehyd oder Formaldehyd, welche sich durch Oxidation von Triäthylamin oder Alkohol durch Luft-Sauerstoff unter dem Einfluss des Pd-Katalysators in situ gebildet haben.

3. Es ist möglich, die 4-Imidazolidinon-Derivate durch Kondensation von Peptiden mit Aldehyden in Alkohol-Wasser Gemischen herzustellen, ohne die Beteiligung von Triäthylamin, Pd-Kohle oder Luft-Sauerstoff.

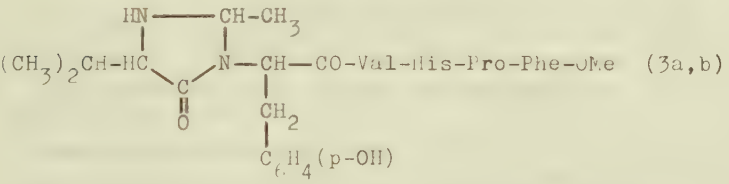
4. Bei Versuchen zur Aminoacylierung erweist sich die N,N'-Alkyliden-Gruppierung als Aminoschutzgruppe gegen verschiedene Carboxyl-aktivierte Aminosäurederivate.

1. ENTSTEHUNG DER 4-IMIDAZOLIDINONDERIVATE AUS PEPTIDEN

1.1 Empirische Reaktionsbedingungen

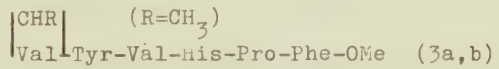
1.1.1 Hydrogenolyse von Benzyloxycarbonyl-Peptiden

Bei Versuchen zur Hydrogenolyse von Z-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (1) zum freien Ester H-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (2), mittels Pd-Kohle und Wasserstoff, wurden in Methanol oder Methanol-NEt_3 wechselnde Mengen eines unpolaren Produktes (3) neben dem freien Ester (2) gefunden [1][3]. Produkt (3) liess sich nicht durch aktivierte Ester aminoacylieren. Durch Hydrolyse in Wasser-Alkohol bei 80°C konnte aus (3) der freie Ester (2) erhalten werden. Wie im Verlaufe dieser Untersuchung gezeigt wird, handelt es sich beim unpolaren Produkt (3) um das Gemisch isomerer 4-Imidazolidinonderivate des freien Esters (2), entstanden durch Kondensation von Acetaldehyd mit der endständigen Amino-, sowie der benachbarten Amidgruppe des Peptidesters:



(3a,b)

In der Kurzschreibweise (vgl. Abschnitt 2.5):



(3a,b)

Die Herkunft des Acetaldehyds erklärt sich aus einer Oxidation von NEt_3 oder Aethanol durch Luft-Sauerstoff unter dem

Einfluss der Pd-Kohle. Methanol kann zu Formaldehyd oxidiert werden [1]. Der Luftsauerstoff hatte vor und nach der Behandlung mit Wasserstoff Zutritt zum Reaktionsgemisch.

1.1.2 Einwirkung von Pd-Kohle, NEt_3, Alkoholen und O_2 auf ungeschützte Peptidester

Zur Präparation grösserer Mengen der 4-Imidazolidinonderivate ist zunächst das oxidative Verfahren mit Pd-Kohle und Sauerstoff optimiert worden.

In parallelen Versuchen wird der Einfluss der verschiedenen Komponenten des Reaktionsgemisches einzeln und in Kombination, unter Konstanz der übrigen Bedingungen verfolgt. Zu vergleichende Ansätze werden gleichzeitig auf derselben Platte (DC) chromatographiert. Der Umsatz kann visuell abgeschätzt werden. Diese Behandlung eliminiert Schwankungen, bedingt durch Unterschiede in der Herstellung, der Entwicklung sowie der Revelation verschiedener Chromatogramme.
Folgendes 'Standard-System' erweist sich als optimal:

10 Gew. Teile Peptid
1 " " Pd-Kohle (10%)
20 " " NEt_3
200 Vol. Teile 96-proz. Aethanol

60-80°C, Durchleiten von Luft oder O_2 während einer Stunde.

Bei Aenderungen im obigen System ergibt sich folgendes Bild:

Lösungsmittel: Absoluter Methyl- oder Aethylalkohol als Lgm unter Ausschluss von Feuchtigkeit verringert die Reaktionsgeschwindigkeit. Erst der Zusatz von 1-5 Volumteilen Wasser beschleunigt die Reaktion auf optimale Werte. Verschiedentlich beobachtet man die Bildung von stark gefärbten, polaren Nebenprodukten, deren Entstehung durch die Verwendung von Aethanol zurückgedrängt werden kann. In höheren Alkoholen (n-Pro-

---

[1] Die ausführliche Diskussion der Oxidationsprozesse ist dem Abschnitt 1.2 'Entstehung der Carbonylkomponente' vorbehalten.

panol, n-Butanol, 2-Propanol) erfolgt die Bildung von 4-Imidazolidinonderivaten weit langsamer. In tert-Butanol, Chloroform, Benzol, Essigester, DMF oder Dioxan beobachtet man überhaupt keine Bildung von 4-Imidazolidinonen.

NEt_3: Ohne Zusatz von NEt_3 bilden sich die 4-Imidazolidinonderivate in Alkohol nur sehr langsam, doch reichen bei ZT einige Tage, um deutliche Mengen davon entstehen zu lassen. Andere Basen, beispielsweise Pyridin haben keinen entsprechenden Effekt. Wie in Abschnitt 1.2.2 gezeigt wird, ist NEt_3 in Gegenwart von Sauerstoff und Pd eine ergiebige Quelle von Acetaldehyd! Deshalb bilden sich selbst in Methanol, beim Zusatz von NEt_3, hauptsächlich die entsprechenden N,N'-Aethyliden-derivate. Im Falle des Tetrapeptidesters (6) isoliert man auch das N,N'-Methylenprodukt (8), welches sich auf dem Chromatogramm von N,N'-Aethylidenderivat unterscheiden lässt. Schliesslich wirkt NEt_3 als Base und begünstigt die Kondensation des Carbonyls mit der Aminogruppe; Säuren schützen das Amin durch Protonierung.

Katalysator: Ein Gew. Teil Pt-Kohle (10%) oder ein Gew. Teil PtO_2 wirken schwächer als die Pd-Kohle.

Sauerstoff: Sauerstoffausschluss, durch gründliches Spülen des Milieus mit Inertgas (N_2, Ar), insbesondere des Katalysators vor der Zugabe des Peptids, verhindert die Aldehydbildung und damit die Entstehung von Imidazolidinonderivaten. Man beachte jedoch, dass Aethanol stets etwas Acetaldehyd enthält, sofern dieser nicht durch spezielle Behandlung entfernt wurde.

Temperatur: Bei ZT benötigt die Reaktion mehrere Tage, oberhalb 50°C bis zur Siedetemperatur des Alkohols ist der Endzustand der Edukt-Produkten-Verteilung in 1-4 Stunden erreicht.

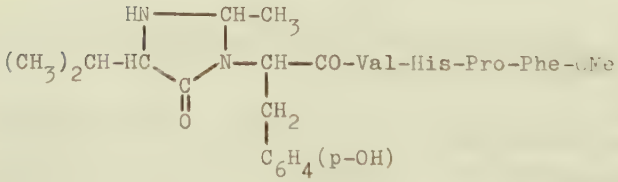
Der Bereich der optimalen Reaktionsbedingungen ist eng, weil sich mindestens zwei verschiedenartige Reaktionen im selben

Milieu abspielen müssen:

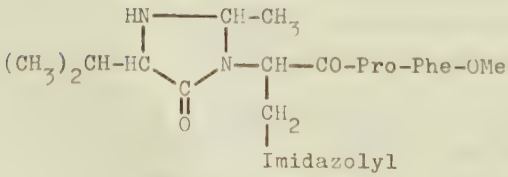
a) Die Oxidation von NEt_3 oder einem Alkohol zur Carbonylverbindung. Es ist bekannt, dass die Oxidation von NEt_3 durch Sauerstoff in Gegenwart von Pd, durch Alkohol als Lgm. begünstigt wird [6].

b) Die Kondensation der Carbonylverbindung mit dem Peptid. Sie benötigt erfahrungsgemäss ein polares Lgm. und vorzugsweise ein basisches Milieu.

Bevor uns andere Synthesewege offenstanden, haben wir im oben beschriebenen 'Standard-System' folgende Imidazolidinone erstmals hergestellt:
(Die Reinigung der nach Abtrennung von Katalysator und Lgm. verbleibenden Rohprodukte erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel.)

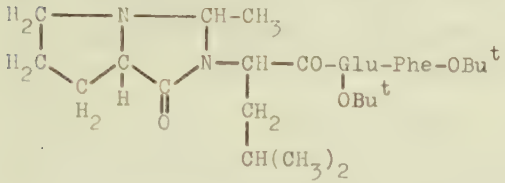


(3a,b)

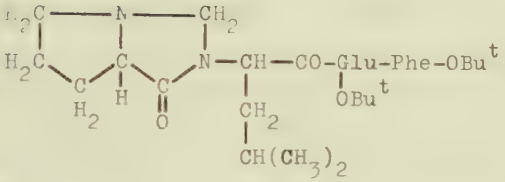


(5a,b)

Aus den Peptiden mit N-terminalem Prolin entstehen die Pyrrolidino-imidazolidinone:



(7)



(8)

1.1.3 Lagerung amorpher Peptidester und ihrer Acetate

Verschiedene amorphe Proben von H-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (2), welche teils frei, teils als Acetate über 2-4 Jahre aufbewahrt worden waren, erwiesen sich laut DC in verschiedenem Ausmass durch meist mehrere unpolare Peptidanteile verunreinigt. Der Vergleich mit den alten, zur Zeit der Synthese angefertigten Chromatogramm-Photographien zeigte, dass die Nebenprodukte bei der Lagerung entstanden sein mussten.

Nähere Untersuchungen in den Laboratorien der Ciba AG (Dr. Riniker) zeigten, dass aus dem Acetat des Hexapeptidesters (2) unter anderem die entsprechende N-Acetylverbindung entstanden war. Auch Acetate anderer Peptide sollen dieses Verhalten zeigen. Aufgrund der vorliegenden Arbeit darf geschlossen werden,

dass in den Gemischen auch das 4-Imidazolidinonderivat von (2) vorlag: Milde Hydrolyse lieferte typisch den Grundkörper (2) zurück. Die Carbonylverbindung wurde im Hydrolysat nicht nachgewiesen und über ihre Herkunft können nur Vermutungen angestellt werden. Der Fall wurde seiner Kompliziertheit wegen nicht weiter untersucht.

1.2 Entstehung der Carbonylkomponenten

Formaldehyd, Acetaldehyd und Aceton, sowie deren Acetate sind nebst Wasser die häufigsten Verunreinigungen in Methanol oder Aethanol [18]. Aceton entstammt der Herstellung, Formaldehyd und Acetaldehyd entstehen durch Autoxidation, sofern die Lagerung nicht unter Luftausschluss erfolgte. Verschiedene Metalle, besonders Cu und Pd katalysieren die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden.

Es lag nahe anzunehmen, dass der zur Bildung der Imidazolidinone nach Abschnitt 1.1 notwendige Acetaldehyd aus dem als Lgm verwendeten Aethanol entstanden war. Die Untersuchung von Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (2) mit NEt_3, Pd-Kohle und O_2 in Methanol ergibt jedoch hauptsächlich das N,N'-Aethylidenderivat (3a,b). Dieser Versuch zeigt, dass bei unseren Reaktionsbedingungen NEt_3 eine Quelle von C_2-Aldehyd darstellt.

1.2.1 Oxidation von Alkoholen durch O_2 unter dem Einfluss von Pd

Die Katalyse der Alkoholoxidation durch Edelmetalle ist seit langem bekannt. Bereits 1855 beschrieb S t r e c k e r [4] die Oxidation des Zimtalkohols mit PtO und O_2 zum Zimtaldehyd. Neuere Verfahren zur Alkoholoxidation unter heterogener Kata-

lyse werden bei H e y n s [5] diskutiert. Kürzlich hat L l o y d [6] diese Verfahren auf homogene Reaktionsgemische ausgedehnt. Er bediente sich dazu Lösungen von $PdCl_2$ in hydroxylhaltigen Lgm und verfolgte den Einfluss verschiedener Bedingungen auf Ausbeute und Produktverteilung. Seine Ergebnisse sind in unserem Zusammenhang von direktem Interesse:

a) $PdCl_2$ oxidiert 1^o und 2^o Alkohol, bei Temperaturen zwischen 70 und 120°C, zu Acetalen und Ketalen, wobei es zu Pd^o reduziert wird; H_2O sowie Cl^--Ionen verzögern die Reaktion. Ein Anfangsgehalt von ca. 10% H_2O vermindert die Reaktionsgeschwindigkeit drastisch.

b) Metallisches Pd^o wird durch O_2 nur langsam oxidiert. Der Zusatz eines Oxidationsmittels, bspw. eines Cu^{2+}-Salzes beschleunigt die Reoxidation sehr, und der Gesamtprozess, d.h. die Alkoholoxidation durch O_2, wird katalytisch:

$$R_2CHOH + PdCl_2 \longrightarrow R_2CO + Pd^o + 2\ HCl$$
$$Pd^o + 2\ CuCl_2 \longrightarrow PdCl_2 + Cu_2Cl_2$$
$$Cu_2Cl_2 + 2\ HCl + 1/2\ O_2 \longrightarrow 2\ CuCl_2 + H_2O$$

$$R_2CHOH + 1/2\ O_2 \longrightarrow R_2CO + H_2O$$

c) Oxidationen mit Pd^{2+} verlaufen in Alkoholen viel rascher, als entsprechende Reaktionen in wässrigen Systemen. L l o y d [6] macht dafür die, im Vergleich zu H_2O schwächere, Kationen-solvatisierende Wirkung der Alkohole verantwortlich. Die geringere Solvatisierung des Pd^{2+} in Alkohol dürfte die Bildung eines, dem Oxidationsschritt vorgelagerten, Pd-Substrat-Komplexes erleichtern und dadurch die grössere Reaktivität in Alkohol erklären.

1.2.2 Oxidation von NEt_3 unter dem Einfluss von Pd

NEt_3 wird in der Peptidchemie häufig als Base verwendet. Mit pK_a = 10.6 ist es eine recht starke Base, sein Siedepunkt von 89°C lässt es am Vakuum leicht entfernen. Als tertiäre Base neigt es nicht zu Substitutionsreaktionen.

Weniger bekannt ist die Unbeständigkeit von NEt_3 und anderen tertiären Aminen gegen Oxidationsmittel. Dies mag daran liegen, dass der Reaktionsverlauf bei der Oxidation von Aminen oft unübersichtlich ist, und die vorgeschlagenen Mechanismen nur in wenigen Fällen bewiesen wurden. Das Gebiet der Amin-Oxidation wurde erst im Verlauf der letzten 15 Jahre systematisch bearbeitet. Eine neuere Zusammenfassung findet sich bei S m i t h [7].

Aus freien Aminen bilden sich, in Abhängigkeit von der Struktur der Substituenten und dem Substitutionsgrad des N, sowie von den verwendeten Reagenzien die verschiedensten Oxidationsprodukte [1]. Abspaltung von Wasserstoff ergibt Aldimine, Ketimine, Enamine oder Nitrile. Zwei Moleküle Amin können zu Hydrazin- oder Azoderivaten kondensiert werden. Die Anlagerung von Sauerstoff führt zu Hydroxylaminen oder Aminoxiden.

Aus tertiären Aminen bilden sich in einem ersten Reaktionsschritt N-Oxide (Einwirkung von Peroxosäuren, Hydroperoxiden oder Ozon), Enamine (verschiedenste andere Oxidationsmittel). Die primären Oxidationsprodukte sind oft instabil und werden nicht isoliert. Spontane Folgeschritte führen meist zu einer Desalkylierung des Amins. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass aus einem tertiären Amin das sekundäre Amin und die entsprechende Carbonylverbindung entstehen:

---

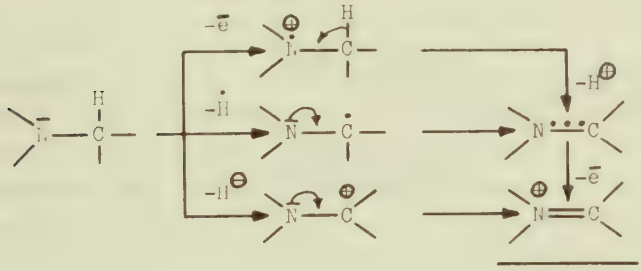
1) In der protonierten Form sind die Amine gegen Oxidation recht beständig.

$R^1R^2N\text{-}CHR^3R^4 \xrightarrow{\text{Desalkylierung}} R^1R^2NH + R^3R^4CO$

(Es stellt dies die Umkehrung der 'reduktiven Alkylierung' eines sekundären Amins mittels Carbonylverbindung und Reduktionsmittel dar.)

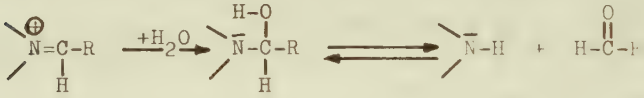
An Oxidationsmitteln, welche mit tertiären Aminen vorwiegend zur Bildung von Enaminen oder deren Folgeprodukten führen, sind zu nennen:
MnO_2 [8][9][10], $KMnO_4$ [11], Cl_2O [12], substituierte Chinone [13], Ozon [14], N-Brom-succinimid [15].
Von besonderem Interesse sind für uns die Oxidationen unter dem Einfluss von Metallionen:
$CuCl_2$ [16], $CuCl + O_2$ [17].

Neben sekundärem Amin und Carbonylverbindung finden sich aber in den meisten Fällen eine ganze Reihe von weiteren Produkten. Vergegenwärtigt man sich die möglichen Mechanismen und die zu erwartenden Zwischenprodukte, so lässt sich die Bildung der 'Nebenprodukte' zwanglos rationalisieren. Der primäre Oxidationsschritt kann verschieden formuliert werden:

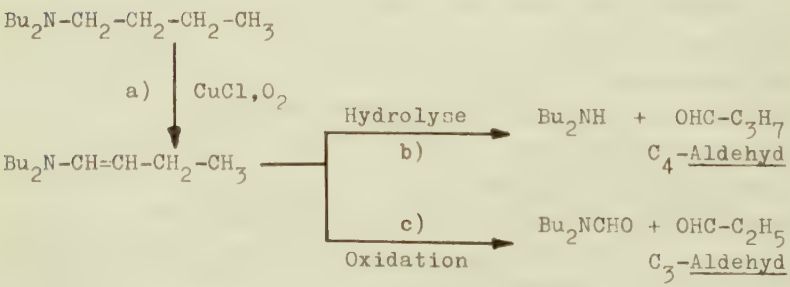


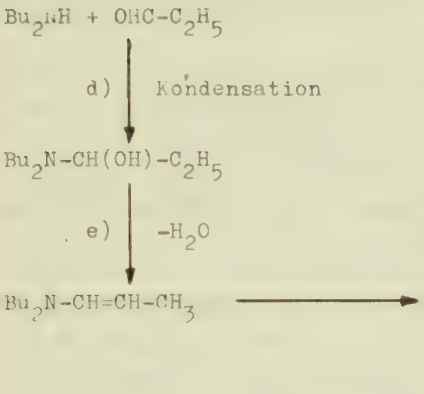
Das gemeinsame reaktive Zwischenprodukt wäre in allen Fällen ein Immonium-Ion. In wasserfreiem Medium kann sich das Immoniumion zum Enamin stabilisieren:

Mit Wasser entsteht das Carbinolamin, welches rasch zu sekundärem Amin und Carbonylkomponente zerfällt:



Durch Folgereaktionen kann der Eindruck eines schrittweisen Abbaus des Alkylsubstituenten erweckt werden. Am Beispiel der Oxidation von Tributylamin mit CuCl, O_2 hat J e r u s s i [17] kürzlich die entsprechenden Produkte nachgewiesen:





Wir nahmen an, dass die Oxidation des NEt_3 durch O_2 unter dem Einfluss von Pd-Kohle analog verliefe zu derjenigen unter dem Einfluss von Cu-Ionen [16][17]. Danach wären an Oxidationsprodukten mindestens zu erwarten:

- die Carbonylverbindungen CH_3CHO, CH_2O,
  sowie deren Acetale,
- die N-Derivate $(CH_3CH_2)_2NH$,
  ev. $(CH_3CH_2)_2NCHO$, $(CH_3CH_2)NCOCH_3$

Andererseits kann der als Lgm verwendete Alkohol ebenfalls oxidiert werden: Aethanol zu CH_3CHO, Methanol zu CH_2O.

Im Hinblick auf die, bei der Herstellung der Imidazolidinone mittels Pd-Kohle und O_2 gemachten Erfahrungen, versuchten wir abzuklären, in welchem Verhältnis CH_3CHO und CH_2O aus den Gemischen von NEt_3 mit Aethanol oder Methanol entstehen würden. Zu diesem Zweck haben wir den Gehalt an CH_3CHO und CH_2O in Reaktionsgemischen bestimmt, welche unserem 'Standard-System' zur Herstellung von Imidazolidinonen (vgl. Abschnitt 1.1.2) entsprechen, jedoch kein Peptid enthalten.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle enthalten: (Mol-Zahlen in Klammern)

	Temp Zeit	CH_3CHO	CH_2O
EtOH (0.35) NEt_3 $(7\cdot10^{-3})$ Pd-Kohle O_2 $(4.5\cdot10^{-3})$	60°C 4 h	$(4\cdot10^{-4})$	$(3\cdot10^{-6})$
MeOH (0.5) NEt_3 $(7\cdot10^{-3})$ Pd-Kohle O_2 $(4.5\cdot10^{-3})$	60°C 4 h	$(1\cdot10^{-4})$	$(0.8\cdot10^{-4})$

Folgerungen:

- Die entstandene Menge Acetaldehyd würde ausreichen, um mindestens 10^{-4} Mol Peptid in sein Imidazolidinon überzuführen. Dies entspräche beispielsweise 78 mg Hexapeptidester (2)!

- Die oxidative Desalkylierung des NEt_3 erfolgt wesentlich rascher, als die Oxidation von Aethanol oder Methanol zum Aldehyd.

- Im Reaktionsgemisch mit Methanol ist neben Acetaldehyd fast dieselbe Menge Formaldehyd entstanden. Trotzdem wurden bei der Herstellung der Imidazolidinone in diesem Lgm - mit der Ausnahme von $\left|{}^{CHH}_{Pro}\right|$Leu-Glu($OBu^t$)-Phe-$OBu^t$ (8) - stets nur die N,N'-Aethylidenderivate isoliert. Dieser Befund weist auf die unterschiedliche Reaktivität der beiden Aldehyde gegen Peptide (vgl. Abschnitt 3.3.2).

1.3 Nebenreaktionen am Peptid

Pd kann die Oxidation weiterer funktioneller Gruppen katalysieren. In neueren Patenten beschrieb L l o y d [19] Oxidationen von Olefinen, aromatischen Kohlenwasserstoffen sowie CO, mittels $PdCl_2$, $CuCl_2$ und O_2 in alkoholischen Lösungen. Benzol wird unter diesen Bedingungen zu Phenol oxidiert [20].

Oxidationen am Peptid sind deshalb als Nebenreaktionen bei der Herstellung von Imidazolidionen nach dem, in diesem Kapitel geschilderten Verfahren (Pd, O_2) zu erwarten. Insbesondere die N-terminale Aminosäure mit ihrer empfindlichen α-NH_2-Gruppe dürfte teilweise zu einer α-Ketosäure oxidiert werden. Bereits im Jahre 1925 hat W i e l a n d [21] mit Pd-Kohle und Sauerstoff aus Aminosäuren die Decarboxylierungsprodukte der entsprechenden α-Ketosäuren isoliert.

1.4 Folgerungen für die präparative Peptidchemie

Hydrierungen über Pd-Kohle zum Zwecke der Abspaltung von Schutzgruppen sind eine häufig geübte Reaktion. Um die Bildung unerwünschter Nebenprodukte zu vermeiden, sind hierbei unbedingt einige Regeln einzuhalten:

a) Katalytische Hydrierungen in Alkohol sollten in saurem Milieu durchgeführt werden, wie dies dem üblichen Verfahren zur Hydrogenolyse von Carbobenzoxy-Peptiden entspricht (Essigsäure oder Alkohol-Salzsäure), da protonierte Aminogruppen gegen Oxidation und Kondensationen beständig sind.

b) Ist ein Säurezusatz unerwünscht und wird in neutralem oder basischem Milieu gearbeitet, muss für strikten O_2-Ausschluss

gesorgt werden (Vorhydrieren des Katalysators, sofortige Abtrennung vom Katalysator nach beendeter Reaktion).

Das Nichtbeachten dieser Regeln führt unter anderem zur Entstehung von Carbonylverbindungen, welche leicht mit Peptidderivaten reagieren können. Neben der von uns untersuchten Reaktion zu 4-Imidazolidinonen müssen auch Reaktionen mit anderen funktionellen Gruppen erwartet werden (vgl. Abschnitt 3.2.2). So wurde uns mitgeteilt, dass sich Peptid-Hydrazide als wahre 'Carbonylfänger' erweisen können [3].

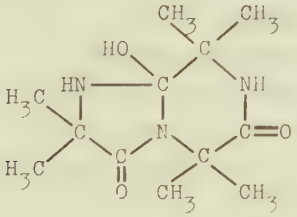
(Schon E d m a n [81] warnte vor den Verfälschungen, welche durch Carbonyl-Verunreinigungen beim Abbau nach der Isothiocyanat-Methode entstehen können mit dem Hinweis, dass Carbonylverbindungen die Aminogruppen blockierten.)

2. STRUKTUR DER 4-IMIDAZOLIDINONE AUS PEPTIDEN

2.1 Hypothesen

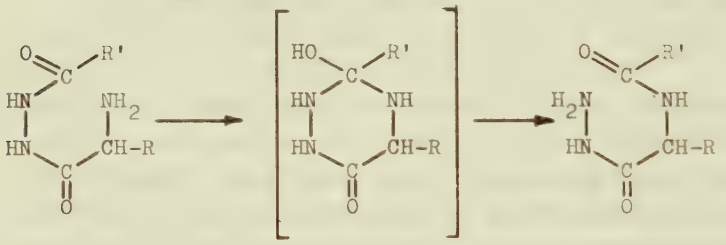
S c h w y z e r [2], welcher erstmals die bei der katalytischen Hydrierung von Carbobenzoxy-Peptidestern auftretenden Nebenprodukte erwähnte, schlug versuchsweise für diese Produkte eine Aza-Cyclol-Form vor:

Das Konzept der Cyclol-Amid-Isomerie wurde immer wieder diskutiert, seitdem W r i n c h 1935 [23] aus formalen Ueberlegungen auf diese Möglichkeit hingewiesen hatte. Dieselbe Autorin widmete diesem Thema eine ausführliche Monographie [24] sowie eine Zusammenfassung neuerer Ergebnisse [29]. Bis heute ist der eindeutige Nachweis isolierbarer Peptid-Azacyclole nur für cyclo-(α-Methyl-Ala)$_3$ erbracht [30], bei welchem die α-Dimethyl-Gruppen die Konformation des Cyclol-bicyclus stabilisieren:



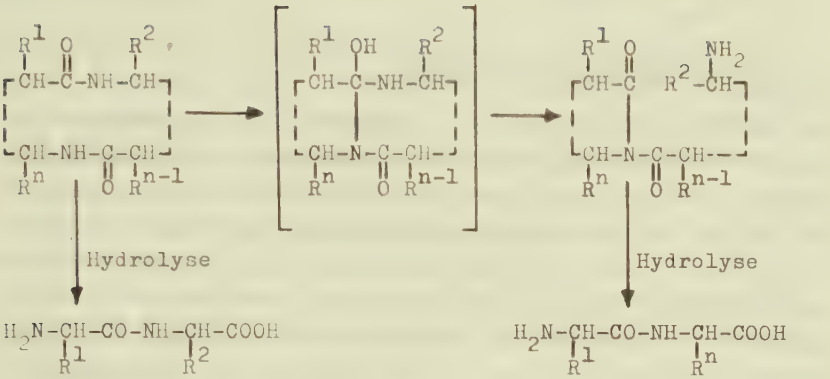
S h k r o b [25] fand an Modellverbindungen, dass andere Azacyclole spontan in die entsprechenden Amide übergehen, oder unter H_2O-Abspaltung Cycloamidine ergeben, welche als Salze isoliert werden können.

Cyclol-artige Strukturen, entstanden durch nucleophilen Angriff an einem Carbonyl-Kohlenstoff, werden als Zwischenprodukte bei verschiedenen Reaktionen postuliert. Als Beispiel diene die Aminodiacylhydrazin-Umlagerung nach B r e n n e r und H o f e r [26], welche zur Peptidsynthese verwendet werden kann:



oder die 'Transpeptidierung' bei der Partialhydrolyse von Peptiden, welche falsche Sequenzbruchstücke produziert und am Beispiel eines cyclo-Dekapeptids der Antamanid-Reihe von P r o x [27] untersucht wurde:

(Schema siehe nächste Seite)



'Sequenzbruchstück' 'falsches Sequenzbruchstück'

Zu Beginn unserer eigenen Untersuchung bot die Möglichkeit einer Komplexbildung des Peptids mit Pd-Ionen Anlass zu einer weiteren Hypothese.

Die Eigenschaften der Produkte befriedigten im Lichte der vorgeschlagenen Hypothesen keineswegs. Erst die Untersuchung geeigneter Peptidderivate im Massenspektrographen zeigte das Vorliegen einer 'peptidfremden' Komponente an und führte uns zur Imidazolidinon-Hypothese, welche im folgenden bestätigt wird. Der Grund, weshalb sich der kondensierte Alkyliden-Rest vorerst unserer Beobachtung entzog, ist vor allem im relativ grossen MG der untersuchten Derivate zu suchen. So kommt im 4-Imidazolidinon-hexapeptidderivat (3) ein Alkyl-Rest vom Formelgewicht = 28 auf einen Peptidteil vom Formelgewicht = 775.

2.2 Instrumentalanalyse

2.2.1 Osmometrische MG-Bestimmung

Das 4-Imidazolidinon (3a,b) von H-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (2) wurde im Knaur'schen Mikrodampfdruck-Osmometer in THF bestimmt. Die Auswertung ergibt ein scheinbares MG von 1150 für (3a,b). Das berechnete MG beträgt 801. Nach den Arbeiten von G o o d m a n [35], ist für geschützte Peptide in diesem Lösungsmittel je nach Anzahl der Amidgruppen sowie der Konzentration verschieden starke Assoziation und damit ein erhöhtes osmotisch wirksames MG zu erwarten. Der gemessene Wert eines scheinbaren MG von 1150 für das Imidazolidinon ist gut mit den Werten vergleichbar, welche G o o d m a n [35] für Z-(γ-Methyl-Glu)$_5$-OMe (MG ber. 880) in Dioxan zu 1325 angibt. Unsere osmometrische MG-Bestimmung ist mit der Imidazolidinon-Struktur des monomeren Peptids vereinbar.

Beim Versuch zur MG-Bestimmung des freien Hexapeptidesters (2) in THF im Osmometer wird die Messgrenze von MG = 100'000 überschritten. Fünf Amidgruppen und eine ungeschützte Aminogruppe bewirken in dem verwendeten schwach solvatisierenden Lösungsmittel diese starke Assoziation. Vergleichsweise MG von 150'000-250'000 (scheinbare) wurden in der Ultrazentrifuge von G o o d m a n [35] bestimmt. Seine Untersuchungen an geschützten Oligomeren (n = 2-11) zeigten, dass in Dioxan oder THF Assoziation und Helixbildung bei n = 5 einsetzen und ab n = 9 zusätzliche Stabilisierung erfahren. Zu analogen Ergebnissen kam auch S h i e l d [80], welcher die osmotischen MG von Tetra-bis Hexapeptiden in Chloroform untersuchte. Helixbildung und Assoziation gelten als kooperative Prozesse.

2.2.2 UV-Spektren

Der Vergleich der UV-Spektren des Tetrapeptidesters (6) mit seinem Imidazolidinon (7) zeigt keine auffälligen Unterschiede. H-Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (6) besitzt nur die schwachen Chromophore der Amidgruppen im fernen UV und des Benzolkerns um 260 mμ (ε 200). Der einzige Unterschied besteht in einer geringen Verschiebung des Beginns der Endabsorption von 220 nm nach 230 nm bei (7). Dieser Befund steht im Einklang mit den UV-Untersuchungen von E d w a r d [28], welcher für nicht-konjugiert substituierte Imidazolidin-4-on-derivate nur Endabsorption bei 220 nm feststellte.

Hingegen ist nach E d w a r d [28] die UV-Spektroskopie zur Strukturaufklärung von Oxidationsprodukten aus 4-Imidazolidinon-derivaten zur Festlegung der Lage der Doppelbindung hilfreich.

2.2.3 IR-Spektren

IR-Spektren finden in der Peptidchemie häufige Anwendung zum Nachweis funktioneller Gruppen sowie zur Verfolgung von deren Umwandlungen, und sind für den Synthetiker von grossem Nutzen. In Verbindung mit der Dünnschichtchromatographie sind sie eine vorzügliche Hilfe bei der Ueberwachung des Reaktionsverlaufs der Einführung von Schutzgruppen und deren Abspaltung. Eine ausführliche IR-Beschreibung der meistverwendeten Schutzgruppen des Urethan-Typus findet sich bei P i n c h a s [38].

IR-Spektren dienen aber auch der Ermittlung des Feinbaus der Peptidderivate, indem der Einfluss von Konformationen oder von Wasserstoffbrücken auf starke Chromophore (z.B. Amidgruppen) analysiert werden kann. Die Aenderung der Absorptionen der Amino- und Amidgruppen in Abhängigkeit von der Sequenz, der

Konzentration und des Lösungsmittels erlaubte G o o d m a n [35] die Analyse der Assoziation verschiedener Modellpeptide. Eine grundlegende Untersuchung über den Einfluss von intra- und intermolekularen Wasserstoffbrücken auf die IR-Absorption von Amidgruppen und deren Anwendung auf das Problem der Sekundärstruktur von Peptiden findet sich bei M i y a z a w a [39]. Eine extensive Anwendung der IR-Spektroskopie auf die Analyse von cis-, trans-Amidbindungen in diastereoisomeren Cyclopeptiden und ihren N-deuterierten Produkten ermöglichte B l a h a [40] Konformationsvergleiche.

4-Imidazolidinon-derivate

Ein Vergleich der Imidazolidinone mit den respektiven ungeschützten Peptidestern mittels IR, zeigt folgende auffälligen Unterschiede:

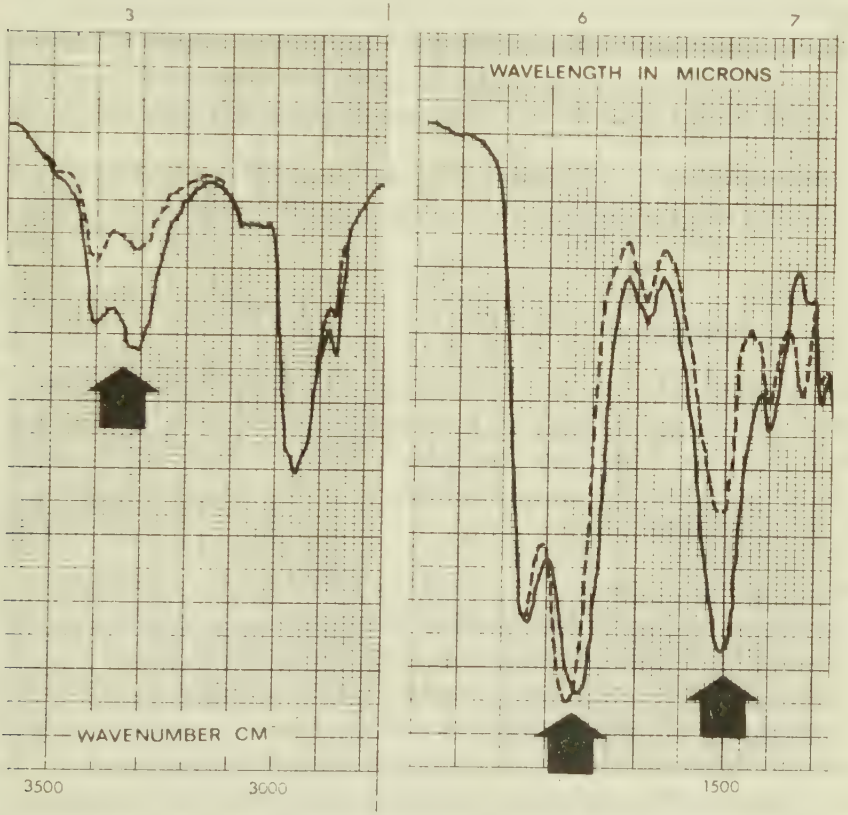
Peptidester		4-Imidazolidinon
3400 cm^{-1}	(NH)	verringert *
3300	(NH)	
1660-80	(CO, Amid I)	verschoben nach 1690 cm^{-1}
1540	(CONH, Amid II)	verringert *
1420-30		zusätzliche starke Bande

(* in Bezug auf die Intensität der Carbonylabsorption bei 1660-1690 cm^{-1} oder bei 1730 cm^{-1})

Eine Verschiebung der Carbonylfrequenz bei ca. 1660 cm^{-1} findet sich bei Lactamen sowie bei cis-Amidbindungen [40]. Es ist bekannt, dass die Amid II-Absorption bei ca. 1540 cm^{-1} bei Lactamen fehlt, oder dass sie bei Amiden verschwindet, wenn das Amid-Proton substituiert wird, z.B. in N-permethylierten Peptiden.

Die Veränderungen im IR können bei kleineren Peptiden als diagnostische Hinweise auf die Imidazolidinon-Struktur dienen.

Bei grösseren Peptiden wird der relative Anteil der veränderten funktionellen Gruppen an der Gesamtabsorption, z.B. der Amidgruppen, zu klein und entzieht sich der Beobachtung. Bei unseren Tetra- und Hexapeptidderivaten können die typischen Veränderungen in allen Fällen beobachtet werden.



IR-Teilspektrum (in $CHCl_3$): —— Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (6)

---| CHR (R=CH_3) |Pro|Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (7)

Als Vergleich dienten uns die Angaben von Z e h a v i [41] über einfache 4-Imidazolidinone und ihre 1-Benzyloxycarbonyl-derivate. IR-Daten von Imidazolidinonen aus Peptiden fanden wir bei H r u b y [42] (Oxytocin) und H a r d c a s t l e [43] (Ampicillin). Bei allen untersuchten 4-Imidazolidinon-derivaten fand Z e h a v i [41] eine zusätzliche starke Bande bei 1420-30 cm^{-1} (in $CHCl_3$). Bei 2,2-Dimethyl-derivaten können auch in komplexen Molekülen z.B. Aceton-Oxytocin [42] oft die charakteristischen Absorptionen der geminalen Dimethyl-gruppen bei 1370, 1390 cm^{-1} beobachtet werden.

Die IR-Daten der von uns untersuchten Peptidderivate unterstützten die Annahme einer 4-Imidazolidinon-Struktur.

2.2.4 NMR-Spektren

Prinzipiell erlaubt die NMR-Spektroskopie Art, Anzahl und Umgebung sämtlicher Protonen zu bestimmen. Die Einschränkungen sind meist apparativ bedingt; die relativ grosse Anzahl der Protonen schon in kleineren Peptiden verlangt die höhere Auflösung der 100 Mhz-Geräte.

Die Amidbindung steht im Mittelpunkt einer ganzen Reihe von NMR-Untersuchungen. Insbesondere die Fragen um die cis-trans-Isomerie der N-Substituenten erweckten grosses Interesse. Die bisherigen Ergebnisse wurden kürzlich von S t e w a r t [45] ausführlich zusammengefasst. Bei der Zuordnung der Resonanzen zu cis- und trans-Substituenten aufgrund einzelner Kriterien wie chemische Verschiebung, Kopplungskonstanten oder Raumbeanspruchung der Substituenten ist Vorsicht geboten. F r u c h t [46] untersuchte mit Hilfe des Overhausen-Effektes (NOE) diverse einfache Amide und verglich seine Ergebnisse kritisch mit früheren Arbeiten. Die Isomerie der Amidbindung ist mit der Konformation von Peptiden eng verknüpft. Eine Review [47]

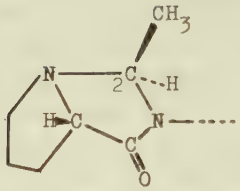
vergleicht NMR mit anderen Methoden zur Konformationsanalyse. Der Einfluss der H-Brückenbildung auf die chemische Verschiebung der N-Protonen in geschützten Peptiden wurde von S h i e l d [34] untersucht. Anhand der Temperatur- und Konzentrations-Abhängigkeit glaubt S h i e l d intramolekulare, intermolekulare, sowie nichtverbrückte Protonen unterscheiden zu können.

NMR-Spektroskopie wurde auch auf zwei Standardprobleme der Peptidchemie angewandt; zur Sequenzanalyse [48] und für Racemisierungsuntersuchungen [49][50][51].

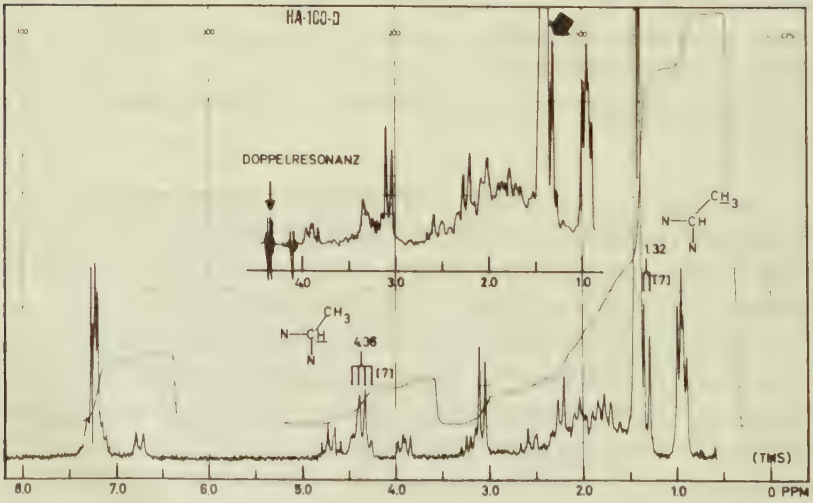
Die Zuordnung der Protonen-Resonanzen wird durch verschiedene Tabellen erleichtert:

	Lgm:	
Aminosäuren, Peptide	H_2O, D_2O	[31][33][37]
Proteine	H_2SO_4 konz.	
Aminosäuren, Proteine	CF_3COOH	[32][36]
Peptide, geschützte Peptide (Amid-, Urethan-Protonen)	$CDCl_3$, CF_3COOD	[34]
geschützte Dipeptide (cis/trans Isomerie am Urethan-N)	$CDCl_3$	[53]

Das Imidazolidinon $\left|\begin{matrix}CHR\\ Pro\end{matrix}\right|$-Leu-Glu($OBu^t$)-Phe-$OBu^t$ (7) ($R=CH_3$) in $CDCl_3$ gelöst, zeigt im 100 Mhz NMR-Spektrum die Resonanzen sämtlicher Protonen des Tetrapeptidesters (6) mit Ausnahme von zwei Amid-Protonen. Zusätzlich findet sich jedoch ein Dublett bei δ = 1.32 entsprechend drei Protonen, sowie ein Quadruplett bei δ = 4.3 entsprechend einem Proton. Die Kopplungskonstante beträgt für beide je 7 Hz. Ein Doppelresonanzversuch mit Einstrahlung bei δ = 4.36 entkoppelt die Resonanz bei δ = 1.32 zum Singulett. Dadurch können die Signale zweifelsfrei den Protonen der N,N'-Aethyliden-Gruppierung zugeordnet werden.

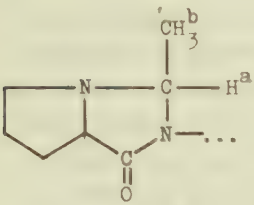


NMR-Spektrum: $\begin{vmatrix}\text{CHR}\\ \text{Pro}\end{vmatrix}$-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (R=CH_3) (7)



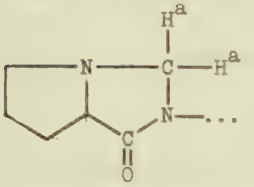
(100 Mhz, in $CDCl_3$)

Tabelle der NMR-Daten



(7)

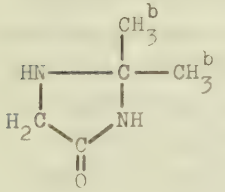
H^a	H^b
4.35 Q [7Hz]	1.32 D [7Hz]



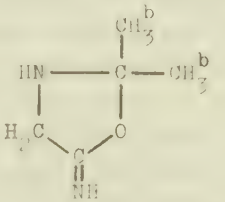
(8)

4.13 D [9Hz]	-
4.60 D [9Hz]	-

Unsere Ergebnisse können mit denjenigen von H r u b y [42] verglichen werden; er fand in 2,2-Dimethyl-imidazolidin-4-on-derivaten von Di- und Tripeptiden in $CDCl_3$ für CH_3^b Werte von 1.2-1.5 ppm. Diesen Werten entspricht auch seine Modellverbindung 2,2-Dimethyl-imidazolidin-4-on (CH_3^b δ = 1.4 ppm), währenddem das isomere 2,2-Dimethyl-5-iminooxazolidin die entsprechende Resonanz bei tieferem Feld (CH_3^b δ = 1.9 ppm) zeigt:

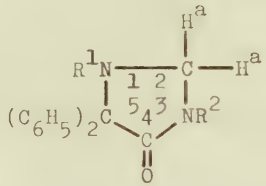


2,2-Dimethyl-
imidazolidin-4-on



2,2-Dimethyl-5-imino-
oxazolidin

Die Uebereinstimmung der chemischen Verschiebung der Ring-Substituenten der Peptid-Derivate mit denjenigen des 2,2-Dimethyl-imidazolidin-4-on darf als Argument zugunsten der Imidazolidin-4-on-Struktur, gegenüber der isomeren Imino-oxazolidin-Struktur gewertet werden. Weitere Vergleiche ermöglicht uns die Arbeit von E d w a r d [54]. Er untersuchte den Einfluss verschiedener Substituenten in 1- und 3-Stellung von 5,5-Diphenyl-imidazolidin-4-on-derivaten auf die chemische Verschiebung in $CDCl_3$:



Für 3-H-1-alkyl-derivate fand er für H^a δ = 4.1-4.4 ppm. Acylierung in 1- oder 3-Stellung verschiebt diese Signale um ca. 0.8 ppm nach tieferem Feld.

Die beiden Protonen in 2-Stellung erscheinen bei den einfachen Derivaten stets als Singulett. In den Peptidderivaten sind die beiden Positionen am C-2 aber nicht gleichwertig; die verschiedene Umgebung wird durch die Asymmetrie am C-5, sowie durch den Peptidrest verursacht. Die magnetische Anisotropie aromatischer Seitenketten kann die Aufspaltung der Signale der 2-Substituenten verstärken (vgl. dazu den 'Aromat-Effekt' von K o p p l e [55]). Wir fanden die Aufspaltung der beiden Protonen H^a in (8) zu 0.47 ppm. H r u b y [42] gibt für iso-Propyliden-peptidderivate die Aufspaltung der 2,2-di-Methyl Protonen (H^b) zu 0.1-0.25 ppm. Dass im N,N'-Aethyliden-peptidderivat (7) die 2-Methylgruppe (CH_3^b) nur ein Dublett zeigt, beweist die Einheitlichkeit von (7) bezüglich der Kon-

figuration am C-2. Da die chemische Verschiebung für die Methylprotonen, in den beiden möglichen Positionen am C-2 sicher nicht identisch ist, kann ein Gemisch der C-2-Epimeren ausgeschlossen werden. (Dasselbe gilt für nur ein Quadruplett des Aethyliden-Protons H^a.) Wir erklären uns die stereo-selektive Synthese durch die räumliche Behinderung, welche ein Prolin-δ-H auf den endo Substituenten am C-2 ausübt. Wir sehen darin auch die Ursache für die extreme Hydrolyse-Empfindlichkeit [1], die H r u b y [42] am N,N'-Isopropylidenderivat von Pro-Leu-Gly-NH_2 beobachtete.

2.2.5 Massenspektren

Die Massenspektrometrie fand in jüngster Zeit zahlreiche Anwendungen auf Strukturprobleme der Peptidchemie. Die Möglichkeit, Molekulargewichtsbestimmung, elementare Zusammensetzung und Sequenzaufklärung in einer Operation zu verwirklichen, erscheint dem Peptidchemiker vorerst wie ein Wunschbild. Und doch ist es, wenigstens für günstige Fälle, realisierbar. Wo liegen heute die Grenzen dieser Methode?

Die im Massenspektrographen zu untersuchenden Peptidderivate dürfen nicht mehr als etwa 10 Aminosäurereste enthalten. Die übliche Meinung, dass Massenspektrometrie die einzige ausserordentlich empfindliche Methode der Analyse darstellt, ist für die Peptidchemie nur bedingt richtig, da hier bereits entsprechend empfindliche 'nasse' Methoden zur Verfügung stehen. In einer neuen Arbeit berichtet A g a r w a l [56] über die Strukturaufklärung eines Hexadecapeptids mittels MS und schreibt: "The foregoing work was accomplished with 180 nmol (400 µg), a substantial quantity by the standards of protein-chemistry..."

---

[1] Vergleiche die Diskussion in Abschnitt 2.3.1

Die Vorteile der Massenspektrometrie für die Sequenzanalyse liegen darin, dass die Sequenz aus dem Ergebnis einer einzigen Operation ableitbar ist, und nicht wie in klassischen Sequenzanalysen als Resultat einer Operationenfolge und den damit verbundenen Unsicherheiten erhalten wird.

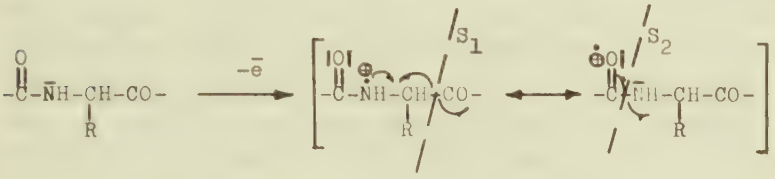
Das Molekulargewicht einer Verbindung ergibt sich aus der Massenzahl des Molekülions (M^+). Durch hochauflösende Massenspektrometrie lässt sich daraus die Bruttoformel berechnen.

Bei der meistverwendeten Ionisierung durch 'electron impact' (EI) erscheint aber M^+ oft nur schwach, oder überhaupt nicht im Spektrum von komplexen Molekülen. In solchen Fällen, und dies gilt besonders für Peptidderivate, könnte in Zukunft mit Vorteil die 'chemische Ionisierung' (CI) angewandt werden, wie sie bereits für Aminosäuren von M i l n e [57] beschrieben ist. Bei der CI entstehen 'Quasi Molekularionen' (QM^+) durch Protonierung eines neutralen Moleküls mittels CH_5^+ und C_2H_5-Ionen in der Gasphase der Ionisationskammer. QM^+ von der Masse MG + 1 haben geradzahlige Elektronen und neigen deshalb weniger zu Fragmentierungen und Umlagerungen als M^+ mit ihren radikalischen Eigenschaften. Im CI-Spektrum finden sich somit, neben dem 'basepeak' QM^+, vor allem die Ionen, welche durch Abspaltung neutraler Moleküle wie Ammoniak, Wasser, Ameisensäure entstehen können.

Das hochauflösende MS ersetzt die klassische Elementaranalyse nicht vollständig. Wohl kann die Bruttoformel einer Molekülspezies exakt bestimmt werden, doch sind über die Reinheit des Musters keine verbindlichen Aussagen möglich. Immerhin gelten auch bezüglich der Aussagekraft der klassischen Elementaranalyse für Peptide gewisse Vorbehalte.

Die Besonderheiten des Zerfalls von Peptidderivaten im Massenspektrographen erlauben die direkte Sequenzanalyse aus dem Spektrum. Das MS eines Peptidderivates kann von der grössten Massenzahl (M^+) her gelesen werden, als ob es durch einen schrittweisen Abbau der Aminosäuren vom Carboxylende her entstanden wäre. Wie erklärt sich dieses Phänomen einer scheinbar gerichteten Fragmentierung?

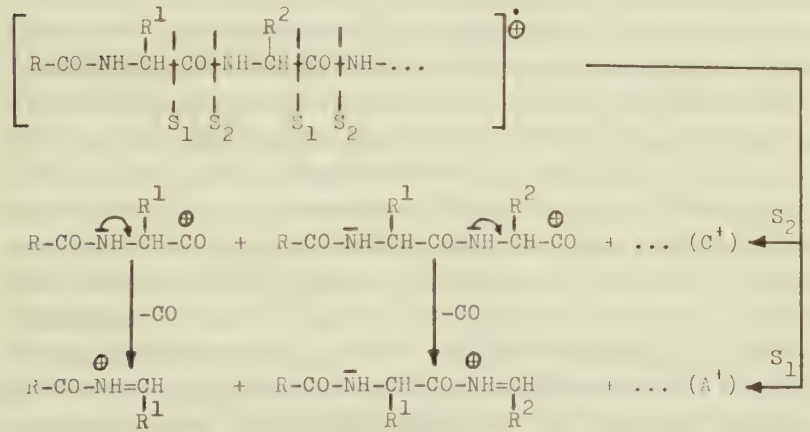
Im Molekül eines N-Acylpeptids kann jede Amidbindung durch Elektronenstoss mit ungefähr gleicher Wahrscheinlichkeit, unter Verlust eines Elektrons, positiv geladen werden. Bei diesem Primärprozess entstehen verschiedene Molekülionen der gleichen Masse M^+:



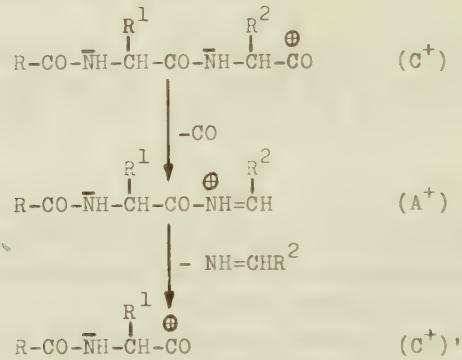
Jedes dieser Molekülionen hat die gleichen Möglichkeiten:

- Durch homolytische Spaltung bei S_1 entstehen Acylimmoniumionen (A^+) und ungeladene Radikale.
- Homolyse der ionisierten Amidbindung bei S_2 führt zu Acyliumionen (C^+) und ungeladenen Radikalen.

(Die radikalischen Spaltstücke sind im Spektrum nicht sichtbar, da ungeladen.)



Acyliumionen (C^+) mit n Aminosäureresten können weiter ein CO-Molekül ausstossen unter Bildung von Ionen (A^+). Ionen (A^+) können ihrerseits ein Molekül R-CH=NH abspalten, sodass ein kleineres Fragment (C^+)' mit n-1 Aminosäureresten entsteht:



Zusammen ergeben beide Reaktionsschritte die Eliminierung eines Aminosäurerestes aus dem Fragment (C^+). Im Fall einer lückenlosen Reihe von Acyliumionen (C^+) entsprechen die aufeinanderfolgenden Massendifferenzen den Massen der im Peptid aufeinanderfolgenden Aminosäurereste. Dasselbe gilt von der Reihe der Acylimmoniumionen (A^+). Im Prinzip gehört zu jedem Acylium-Peak ein um 28 m/e (CO) ärmerer Acylimmonium-Peak, eine theoretisch zu erwartende Regelmässigkeit die, sofern sie im Spektrum sichtbar ist, die Peakzuordnung wesentlich erleichtert. Würde das Spektrum eines Peptids nur aus den Reihen der Ionen (A^+) und (C^+) bestehen, so könnte im MS die Sequenz vom Carboxylende her direkt abgelesen werden. In der Praxis sind diese Reihen oft unvollständig, und überdies enthalten die Spektren eine grosse Zahl von Peaks aus andersartigen Zerfallsprozessen. Dadurch können Schwierigkeiten bei der Interpretation auftreten. Sie werden nachstehend im Zusammenhang mit anderen Problemen der praktischen MS diskutiert.

Flüchtigkeit: Ungeschützte Peptide sind zu wenig flüchtig, um im Massenspektrographen untersucht zu werden. Durch Acylierung der Aminogruppen, beispielsweise mit Fettsäuren [61], Trifluoressigsäure [60], oder Benzyloxycarbonylchlorid [59] wird die Flüchtigkeit verbessert. Am besten geeignet sind N-acylierte Peptidester, diese lassen sich über ein 'Direkt-Einlass-System', bei Temperaturen von 150-250°C aufnehmen. Ein Vergleich der verschiedenen N-Schutzgruppen durch A p l i n [58] ergab, dass die einfache Acetyl-Gruppe bezüglich der Flüchtigkeit der Derivate, sowie der Intensität der Fragmentionen die meisten Vorteile bietet.

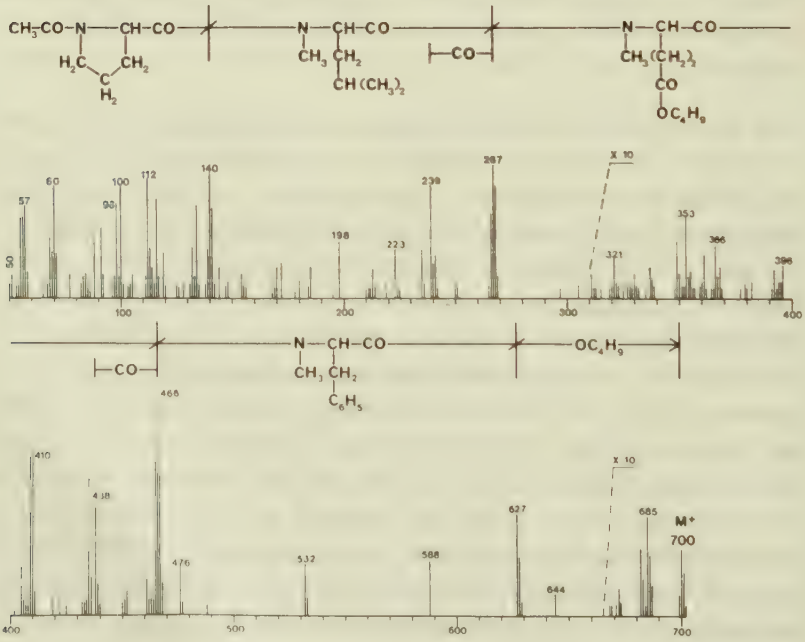
Nebenreaktionen: Umlagerungen und Eliminierungen in den Aminosäure-Seitenketten (-OH, $-NH_2$, -SH, $-C_6H_5$ aber auch Alkyl) erschweren es, die 'Sequenzionen' zu bestimmen. Durch sogenannte Differenzschemata, teilweise mit Computer-Hilfe konnten sehr komplexe Spektren interpretiert werden W e y g a n d [60].

Eine neue Methode erlaubt es nun, gleichzeitig die Flüchtigkeit zu erhöhen, damit die Temperatur des Einlassteils zu erniedrigen, sowie Nebenreaktionen zu vermindern, und damit das Spektrum stark zu vereinfachen. Sie besteht darin, alle Amid-Wasserstoffe durch unpolare Gruppen (CH_3-) zu substituieren und wird als Permethylierung bezeichnet. Eine Reihe erfolgreicher Strukturaufklärungen belegt die Nützlichkeit des Verfahrens [56][62][63]. Eine Zusammenfassung der Anwendungen und der Schwierigkeiten der Permethylierung von Peptiden findet sich bei A g a r w a l [56] sowie bei T h o m a s [63]. Besondere Aufmerksamkeit verlangen Peptide mit Tryptophan- und Histidin-Resten. M i l n e [64] fand in solchen Fällen regelmässig Molekülionen M^+, welche um +14 Masseneinheiten schwerer waren als das Molekül der eingeführten Substanz. Er fand die Ursache in einer intermolekularen Kern-Methylierung, wobei Methylestergruppen als CH_3-Donatoren verantwortlich gemacht werden. Tryptophan- und Histidin-haltige Peptide können auch

nicht permethyliert werden, da durch Alkylierung der Heterocyclen quaternisierte Derivate entstehen, welche zur Massenspektrometrie ungeeignet sind.

Die Interpretation der MS von Aminosäure- und Peptidderivaten wird durch die Uebersichten von H e y n s [66] und von J o n e s [67] sehr erleichtert.

Als Beispiel für das MS eines permethylierten Peptids diene das, nach T h o m a s [63] acetylierte und permethylierte Derivat des Tetrapeptidesters (6):



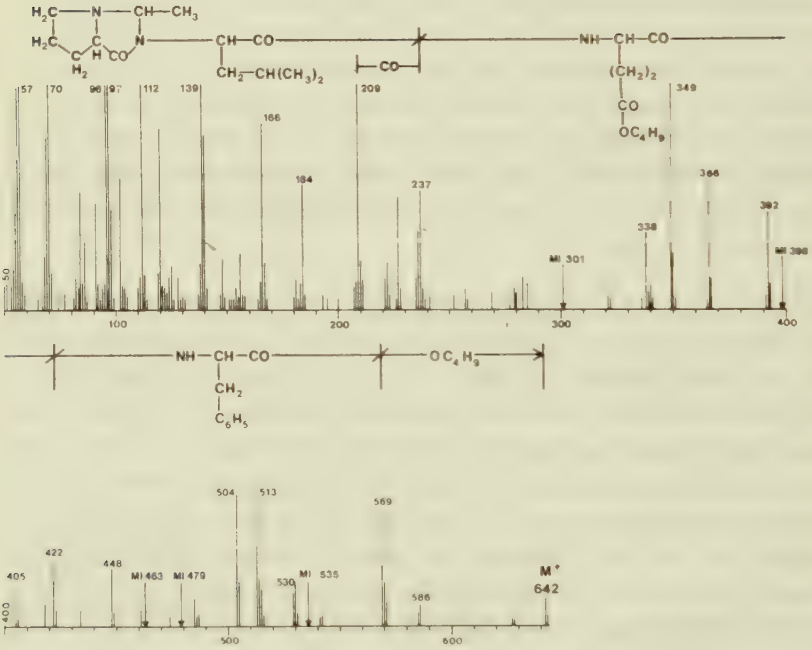
Das Spektrum wird dominiert durch die Sequenzionen, sowie die ihnen entsprechenden Fragmentionen, welche durch Umlagerung an drei Stellen des Moleküls, je unter Ausstoss eines C_4H_8-Moleküls (56 m/e) entstehen können.

4-Imidazolidinonderivate

Massenspektren der Imidazolidinone aus Peptiden erlauben es, das exakte Molekulargewicht, die Bruttoformel, die Sequenz der Aminosäuren sowie die Verknüpfungsstelle des Alkylidenrestes (Amid-N) zu bestimmen. In den von uns untersuchten Fällen konnte stets auch eine für 4-Imidazolidinonderivate typische Fragmentierung, die Abspaltung eines Isocyanates aus dem Ring, beobachtet werden.

Die N,N'-Alkylidengruppierung reicht als Aminoschutzgruppe aus und bewirkt erhöhte Flüchtigkeit, sodass sich 4-Imidazolidinone von Peptidestern gut für die Untersuchung im Massenspektrographen eignen. Vorgängig einer allfälligen Permethylierung muss der Aminostickstoff des Imidazolidinonrings acyliert werden, da sonst quaternisierte Derivate entstehen würden. Bei unseren Prolinderivaten (7) und (8) ist dies nicht möglich, sodass wir auf die Vorteile der Permethylierung verzichten müssen. Da unsere übrigen Peptide Histidin-haltig sind, können auch sie nicht permethyliert werden.

Massenspektrum: $\underline{\text{Pro-Leu-Glu(OBu}^t\text{)-Phe-OBu}^t}$ ($R=CH_3$) (7)



Molekülion

642 = M^+

642.3992 (hochauflösend)

$C_{35}H_{54}O_7N_4$ (Fehler in tausendstel Masseneinheiten $\Delta = 9.1$)

Sequenzionen

422 = M^+ - (Phe-OBu^t)

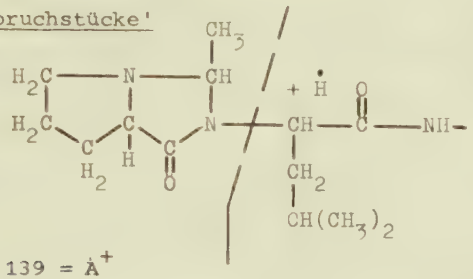
237 = 422 - (Glu(OBu^t))

hochaufl. 237.1564

↓

$C_{13}H_{21}O_2N_2$ (Δ = 2.7)

'Schlüsselbruchstücke'



139 = A^+

hochaufl. 139.0886

↓

$C_7H_{11}N_2O$

(Δ = 1.6)

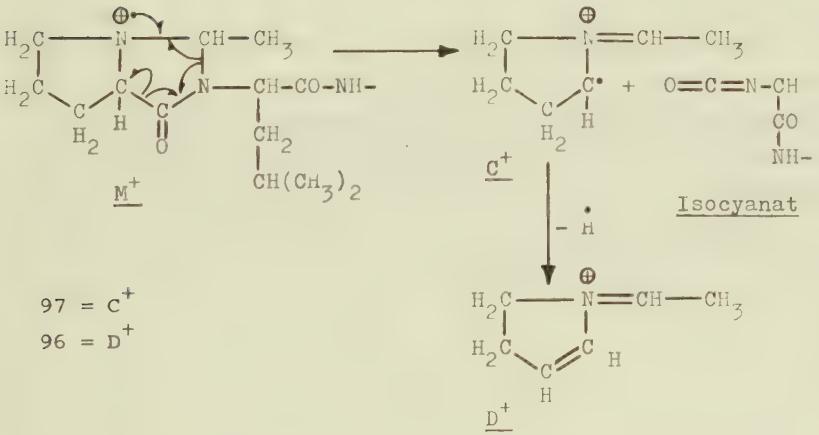
504 = B^+

hochaufl. 504.3214

↓

$C_{28}H_{44}N_2O_6$

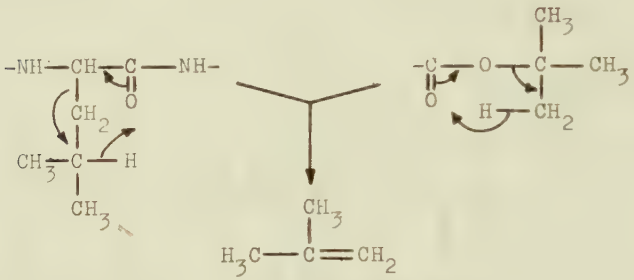
(Δ = 1.5)



97 = C^+

96 = D^+

Das Spektrum wird durch McLafferty-Umlagerungen der Leucin-Seitenkette, sowie der tert-Butylester, welche am drei Stellen des Moleküls die Abspaltung eines C_4H_8-Fragmentes erlauben, kompliziert:



C_4H_8 (m/e 56)

Beispiele:

586 = M^+ - (C_4H_8) MI = 535.5

530 = 586 - (C_4H_8) MI = 479.0

513 = 569 - (C_4H_8) MI = 463.0

448 = 504 - (C_4H_8) MI = 398.5

349 = 405 - (C_4H_8) MI = 301

Homolyse der Esterbindung unter Abspaltung von $^{\cdot}OC_4H_9$-Radikal gibt weitere, für die t-Butylestergruppe charakteristische Bruchstücke:

Beispiel: 569 = M^+ - (OC_4H_9)

MS von |CHH|Pro|Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (8)

Das Spektrum erweist sich in allen wichtigen Punkten als homolog (um -14 Masseneinheiten verschoben) zum Spektrum des Aethylidenderivates (7). Vergleiche die Tabelle der wichtigen Fragmente:

	M^+	A^+	B^+	C^+	D^+
N,N'-Aethyliden-derivat (7)	642(13)	139(100)	504(60)	97(100)	96(100)
N,N'-Methylen-derivat (8)	628(78)	125(100)	504(30)	83(75)	82(20)

(Relative Intensitäten in Klammern)

Vergleichbare Angaben zum Verhalten von 4-Imidazolidinon-derivaten im MS sind uns nur von E d w a r d [54] bekannt. Die von ihm beobachtete Abspaltung eines Isocyanates R-N=C=O aus der Lactamgruppe des Rings ($M^+ \longrightarrow C^+$, vgl. p 39) konnte auch bei unseren Peptidderivaten beobachtet werden. Die Massenspektren unserer Alkylidenpeptidderivate unterstützen die Annahme einer 4-Imidazolidinon-Struktur, insbesondere bestätigen sie die Verknüpfung des Alkylidenrestes mit dem Stickstoff der zweitletzten Aminosäure. Die für die Interpretation wichtigen Fragmentionen konnten durch metastabile Ionen (MI), sowie durch hochauflösende Bestimmungen (Bruttoformeln) gesichert werden.

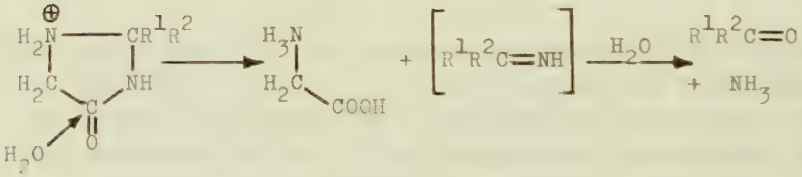
2.3 Chemische Analyse

2.3.1 Hydrolyseverhalten

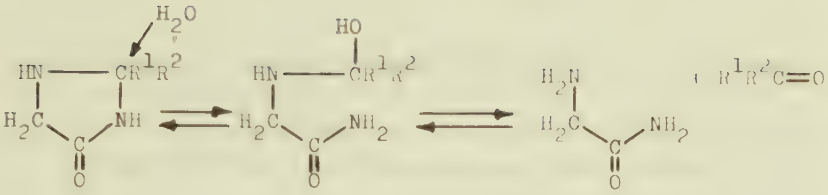
Durch Hydrolyse kann aus den 4-Imidazolidinonen der Alkylidenteil als Carbonylverbindung abgespalten werden. Geschwindigkeit und Verlauf der Hydrolyse werden durch die Substituenten am Ring beeinflusst und sind stark vom pH abhängig.

a) Hydrolyse bei verschiedem pH:

Z e h a v i [41] hatte die Hydrolyse von einfachen 4-Imidazolidinonen untersucht und fand eine überraschende Beständigkeit in stark saurem Milieu, hingegen eine rasche Spaltung zu Carbonylverbindung und Aminosäure bei pH ca. 7. Für die Hydrolyse in stark saurem oder in neutralem Milieu schlägt er verschiedenartige Mechanismen vor. So soll der protonierte Imidazolidinonring durch Wasser am Carbonyl-C angegriffen werden:

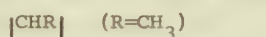


Die Hypothese wird dadurch gestützt, dass als Hydrolyseprodukte der sauren Hydrolyse stets nur die Aminosäure und nicht das Amid entsteht, sowie durch den messbaren Einfluss verschiedener Substituenten am Alkyliden-C auf die Hydrolysegeschwindigkeit. In neutralem Medium stellt er sich, in Uebereinstimmung mit der allgemeinen Auffassung, die Hydrolyse als Umkehrung des Kondensationsschrittes vor:



Die Hydrolyse wird erst vollständig, wenn das Edukt-Produkt-Gleichgewicht, beispielsweise durch Entfernen der Carbonylkomponente, gestört wird. Als Hydrolyseprodukt entsteht das Amid der Aminosäure.

Wir haben die Abhängigkeit der relativen Hydrolysegeschwindigkeit vom pH qualitativ am Beispiel des N,N'-Aethylidenderivats



untersucht, indem wir nach 20 Min., bei 80°C, die auf verschiedene pH-Werte gepufferten Lösungen mittels DC auf den Hydrolysegrad untersuchten. Wir finden für die Hydrolysegeschwindigkeit ein Maximum bei pH = 6.5 ($1 < pH < 10$, Schritte à 0.5 pH). Unterhalb pH = 3.5 nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit stark ab. Bei pH = 1 ist nach 1 h bei 80°C mittels DC nur geringe Hydrolyse nachweisbar. Durch 6N HCl kann die Methylestergruppe von (3a,b) unter Erhaltung des Imidazolidinonringes verseift werden. Das Imidazolidinon (3a,b) ist auch gegen verdünnte Basen relativ beständig. Mit 2N NEt_3 in Wasser kann die Methylestergruppe ebenfalls selektiv hydrolysiert werden.

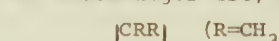
Im allgemeinen gilt für 4-Imidazolidinone, dass sie durch Kochen in wässriger Lösung bei neutralem pH rasch zerfallen. Zur vollständigen Hydrolyse muss die Carbonylkomponente aus dem Reaktionsgemisch, beispielsweise durch azeotrope Destilla-

tion, entfernt werden. Sie kann im Dampfdestillat dann quantitativ nachgewiesen werden.

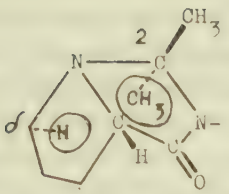
b) Einfluss der Substituenten am Alkyliden-C auf die Hydrolyse: Substituenten am C-2 des Imidazolidinonringes können das Hydrolyseverhalten stark beeinflussen. So beobachtete Z e h a v i [41] an 2-Phenyl- und 2-spiro-Cyclohexano-imidazolidin-4-on in 5N HCl bei ZT nach 100 h nur unvollständige Hydrolyse, während unter denselben Bedingungen das 2-(4-Nitrophenyl)-derivat nach 24 h grösstenteils zersetzt war. Unter denselben Bedingungen hydrolysierte α-Benzyliden-aminoacetamid (Schiff'sche Base) innert 12 h vollständig.

Wir haben den Einfluss der Methyl-Substituenten am N,N'-Alkyliden-C auf die Hydrolysierbarkeit unserer Imidazolidinone qualitativ untersucht. Die Aethylidenderivate (3a,b), (5a,b) und (7) werden durch Wasser bei ZT nur langsam, bei 100°C in 10-60 Min. vollständig hydrolysiert. Dieses Verhalten entspricht demjenigen der Isopropylidenderivate von H r u b y [42]. Beim Vergleich fällt auf, dass unser Aethylidenderivat

viel beständiger ist, als H r u b y 's Isopropylidenderivat



welches schon beim Kontakt mit kaltem Wasser Aceton abspaltet. Wir führen das unterschiedliche Verhalten der beiden Prolinderivate auf die spezielle sterische Situation im Bicyclus zurück. Molekül-Modelle zeigen eindeutig eine gegenseitige Behinderung der endo-Substituenten α-H(Prolinring) und 2-CH_3 (Imidazolidinring) im Acetonderivat:



(Der gleiche Umstand erklärt nach unserer Meinung die stereospezifische Kondensation von Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (6) mit Acetaldehyd zu nur einem der möglichen C-2-Epimeren (7), wie auch die Schwierigkeit, Peptide mit N-terminalem Prolin mit Aceton zu kondensieren H r u b y [42].)

Unser Methylenderivat $\left|\begin{matrix}CHH\\ Pro\end{matrix}\right|$-Leu-Glu($OBu^t$)-Phe-$OBu^t$ (8)
erweist sich gegen Hydrolyse als ausserordentlich beständig. Es wird durch mehrstündiges Kochen in Wasser bei pH = 6.5 nicht verändert, erst die Bedingungen der sauren Totalhydrolyse spalten es unter Freisetzung der Aminosäuren. Diese extreme Stabilität überrascht uns, obwohl aus der Chemie der cyclischen Acetale zu erwarten war, dass die Methylenderivate weniger Hydrolyse-empfindlich sein würden, als ihre substituierten Homologen. Die erhöhte Stabilität der cyclischen CH_2-Acetale der Zucker ist wohl bekannt B e l d e r [68].

c) Einfluss von N-Alkyl:
Alkylsubstituenten am N-3 (Amid-N) scheinen die Hydrolyse einfacher 4-Imidazolidinone nicht sehr zu beeinflussen. Hingegen stellte Y a m a s h i r o [69] beim 1-N-Methylderivat des N,N'-Isopropyliden-oxytocin im Vergleich zum nicht-methylierten Derivat grössere Hydrolysebeständigkeit fest.

d) Einfluss von N-Acyl:

1-N-Acylierung reduziert die Empfindlichkeit von einfachen 4-Imidazolidinonen gegen Hydrolyse beträchtlich. Die 'Carbonylkomponente' ist jetzt als N,N'-Alkylidendiamid maskiert und kann nur nach Hydrolyse von Amidbindungen angegriffen werden. So erwiesen sich alle 1-Carbobenzoxyderivate von solchen 4-Imidazolidinonen, welche durch verdünnte Säure oder Lauge hydrolysiert wurden, als stabil Z e h a v i [41], F r e t e r [70]. Versuche, welche 1-Acetyl- und 1-Benzoylderivate partiell hydrolysieren sollten, führten stets zur freien Aminosäure E d w a r d [71].

Der Vergleich mit dem Hydrolysenverhalten der isomeren 5-Imino-oxazolidin-derivate [1] deckt wesentliche Unterschiede auf. H r u b y [42] fand, dass 5-Imino-oxazolidine bereits durch kaltes Wasser zum Aminosäureamid und zur Carbonylkomponente hydrolysiert werden. Mit kaltem 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens ergeben sie sofort einen Niederschlag des entsprechenden Hydrazons. 4-Imidazolidinone reagieren nicht mit kaltem 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens.

2.3.2 Bestimmung der Carbonylkomponenten

Aceton: Qualitativ weisen wir Aceton in Lösungen durch einen modifizierten Legaltest mittels 'Acetest-Tabletten' nach. ('Acetest' ist als klinisches Reagens auf Ketonkörper in physiologischen Flüssigkeiten im Handel erhältlich.) Als spezifischer Nachweis eignet sich der Vergleich der 2,4-Dinitrophenylhydrazone (DNPH) mittels DC. Die Derivate werden durch

---

[1] Ihre Verwandtschaft mit den 4-Imidazolidinonen wird in Abschnitt 3.1 diskutiert.

Erhitzen der zu untersuchenden Probe (ca. 1 mg) mit DNP-Reagens in der Kapillare gewonnen.
Quantitativ bestimmen wir Aceton spektrophotometrisch im Destillat der Wasserdampfdestillation nach der Salicylaldehyd-Methode von B e r n t s s o n [72].

Acetaldehyd: Qualitativ verwenden wir den Vergleich der DNPH mittels DC wie beim Nachweis von Aceton.
Quantitativ bestimmen wir Acetaldehyd spektrophotometrisch im Destillat der Wasserdampfdestillation mit Hydroxybiphenyl-Reagens nach S t o t z in der Ausführungsform von P r e u s s m a n n [73].

Formaldehyd: Qualitativer Nachweis als DNPH mittels DC wie beim Nachweis von Aceton.
Quantitativ bestimmen wir Formaldehyd spektrophotometrisch mit Chromotropsäure im Wasserdampfdestillat nach M c F a d a y e n in der Ausführungsform von P r e u s s m a n n [73].

Mit der Ausnahme des hydrolysebeständigen N,N'-Methylenderivates (8) können aus unseren Imidazolidinonen die Carbonylkomponenten im Molverhältnis freigesetzt werden.

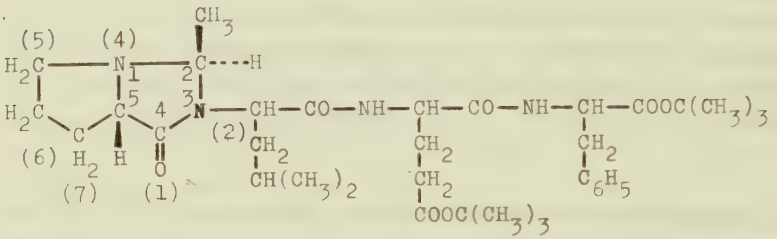
2.3.3 Bestimmung der Aminosäuren

Die Totalhydrolyse der 4-Imidazolidinone und die quantitative Bestimmung der Aminosäuren nach S t e i n und M o o r e [79] ergibt in allen von uns untersuchten Fällen Uebereinstimmung mit der Aminosäuren-Zusammensetzung des zu Grunde liegenden Peptids.

2.4 Strukturbeweis am Beispiel des

CHR | (R=CH_3)
Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (7)

Die Kurzformel im Titel bedeutet:



(Die genaue Bezeichnung des Heterocyclus wäre: Perhydro-1H-pyrrolo [1,2c] imidazol-1-on-2-yl. Der Einfachheit halber, und um die Analogie zu den nicht Prolin-haltigen Derivaten zu wahren, werden wir diesen Heterocyclus weiterhin als substituiertes 4-Imidazolidinon betrachten.)

Im folgenden fassen wir die Beweise für die einzelnen Strukturelemente zusammen. (Das 4-Imidazolidinon (7) wird kurz als 'Produkt' bezeichnet.)

Aminosäuren-Zusammensetzung und Sequenz der ursprünglichen Peptidkette bleiben intakt:

- Die Aminosäuren-Analyse des Totalhydrolysats zeigt keinen Unterschied zwischen dem Produkt (7) und dem Tetrapeptidester (6).
- Das Produkt (7) lässt sich durch milde Hydrolyse in den Tetrapeptidester (6) zurückführen.

- Im NMR-Spektrum des Produkts (7) sind die Signale sämtlicher C-Protonen des Peptidteils identifizierbar.

Die Estergruppen sind im Produkt unverändert erhalten:
- Im NMR-Spektrum des Produkts (7) finden sich die Signale der 18 Protonen der t-Butylestergruppen, gegenüber dem Tetrapeptidester (6) unverändert.
- Die Esterbanden im IR verschwinden, wenn das Produkt (7) mit Säure behandelt wird (Abspaltung der t-Butylreste als Isobutylen).

Das Produkt enthält nur ein Molekül des ursprünglichen Peptidesters:
- Bei der Hydrolyse wird 1 Mol Carbonylkomponente auf 1 Mol Peptid freigesetzt.
- Das MS weist als höchste Massenzahl einen M^+ Peak auf, welcher dem Kondensationsprodukt aus 1 Mol Carbonylkomponente und 1 Mol Peptidester entspricht.
- Das im Osmometer gemessene MG schliesst ein Kondensationsprodukt aus 1 Mol Carbonylkomponente und 2 Mol Peptidester aus.

1. Schlussfolgerung: Vermutliches Molekulargewicht MG = 642.

Im Produkt ist ein Wasserstoff der ursprünglich N-terminalen Iminogruppe substituiert:
- Die Basizität der freien Iminogruppe des Tetrapeptidesters (6) pK_a ca. 8.0 ist im Produkt (7) auf pK_a ca. 3.5 reduziert.
- Das Produkt (7) kann durch Essigsäureanhydrid, auch unter energischen Bedingungen, nicht mehr acyliert werden.
- Das Produkt (7) reagiert auf Dünnschichtchromatogrammen, im Gegensatz zum Tetrapeptidester (6), nicht mehr mit Ninhydrin-Reagens.

Im Produkt (7) fehlt ferner ein ursprünglich vorhandener Amid-Wasserstoff:

- Der Vergleich der IR-Spektren des Peptidesters (6) mit dem Produkt (7) zeigt eine Abnahme der Amid II-Bande um ca. 30 Prozent. (Die Amid II-Bande wird bekanntlich einer Kombinationsschwingung der Gruppierung -CO-NH- zugeschrieben.)
- Im NMR-Spektrum des Produkts (7) entspricht das Integral der N-Protonen-Signale nur noch zwei Protonen gegenüber vieren im Spektrum des Peptidesters (6).

Als neues Strukturelement erscheint im Produkt die Aethylidengruppe $>CH-CH_3$:

- Nach der Hydrolyse kann 1 Mol Acetaldehyd pro Mol Peptid nachgewiesen werden.
- Hochauflösende Massenspektrometrie ergibt für das Molekülion $M^+ = 642$ die Bruttoformel:

Peptidester (6)	$C_{33}H_{52}N_4O_7$
+ Aethyliden	+ C_2H_4
- 2 H	- H_2
	$M^+ = C_{35}H_{54}N_4O_7$

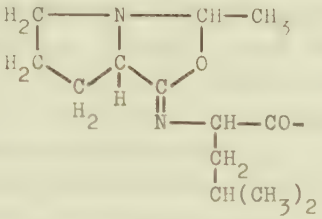
- Im NMR-Spektrum können die Protonen-Resonanzen eines an N oder O gebundenen Aethylidenrestes eindeutig identifiziert werden (chemische Verschiebung, Kopplung, Doppelresonanz).

2. Schlussfolgerung: Das Produkt (7) enthält einen Heteroring.

Der neu entstandene Ring ist ein 5-Ring:

- Die denkbaren Heteroringe mit 8 oder 11 Gliedern werden aufgrund der Sequenzionen im MS ausgeschlossen.

Es handelt sich beim fraglichen Ring um ein 4-Imidazolidinon: Gegen die Struktur eines, prinzipiell ebenfalls möglichen, 5-Iminooxazolidin sprechen:



- Die Basizität des Produkts (7) (pK_a ca. 3.5) entspricht nicht derjenigen der Imidate (pK_a ca. 7-9) S m i t h [75].
- Das Produkt (7) ist gegen hydrolytische Bedingungen wesentlich beständiger als ein 5-Iminooxazolidin, welche bereits in kaltem Wasser hydrolysieren.
- Im NMR-Spektrum entspricht die chemische Verschiebung der 2-Methylgruppe (δ = 1.3 ppm) des Produkts nicht derjenigen der Modellverbindung 2,2-Dimethyl-5-iminooxazolidin (δ = 1.9 ppm) H r u b y [42].

Für die Struktur eines 4-Imidazolidinons sprechen:

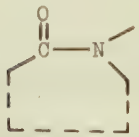
- Der beim Produkt (7) gemessene pK_a ca. 3.5 entspricht gut dem Mittelwert pK_a = 3.9, welcher von O s a m u [76] an verschieden 5-substituierten 4-Imidazolidinonen beobachtet wurde.
- Die Stabilität des Produkts gegen Hydrolyse und deren pH-Abhängigkeit stimmt mit den Angaben von H r u b y [42] und Z e h a v i [41] überein.
- Die chemische Verschiebung der 2-Methylgruppe im NMR-Spektrum entspricht derjenigen analoger 4-Imidazolidinonderivate H r u b y [42], E d w a r d [54].
- Ein wichtiges Indiz bildet das Auftreten von Fragmentionen

(A^+), (B^+) im Massenspektrum (in Abschnitt 2.2.5 als 'Schlüsselbruchstücke' bezeichnet). Sie werden zurückgeführt auf eine Spaltung der Bindung zwischen N und α-C des Leucin-Restes, ein Spaltungstyp, wie er bei Peptiden, welche keine Imidazolidinon-Struktur enthalten, nicht beobachtet wird.

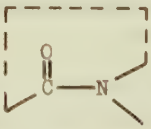
- Das Produkt (7) kann durch einfache Kondensation mit Acetaldehyd erhalten werden (vgl. Abschnitt 3.3.2). Aehnliche Reaktionsbedingungen führten bei H r u b y [42] und H a r d c a s t l e [43] stets zu 4-Imidazolidinonen (H r u b y stützt sich auf den Vergleich mit isomeren Modellverbindungen H a r d c a s t l e auf eine absolut gesicherte Röntgenstrukturanalyse).

3. Schlussfolgerung: Das Produkt (7) ist formal das Resultat einer Kondensation der Carbonylverbindung mit dem N-terminalen Imin-N und dem benachbarten Amid-N zum 4-Imidazolidinonderivat.

Die Isomeriemöglichkeiten im Produkt sind beschränkt:
Zu kleinen Ringen ist der Ringschluss nur über einer cis-Amid Gruppierung möglich; die in vielgliedrigen Ringen, beispielsweise cyclo-Peptiden, bekannte Isomeriemöglichkeit des cis-trans Lactams entfällt:



cis-Lactam



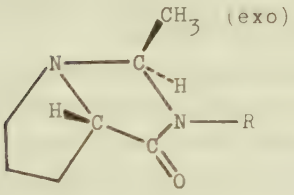
trans-Lactam

Die Konfiguration am C-2 (Alkyliden-C) ist laut Molekülmodell nicht unabhängig von der Konfiguration am C-5:

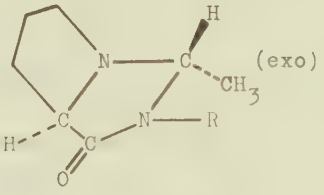
- Der Energieunterschied der beiden Epimeren (C-2) ist, wie sich aus dem Experiment schliessen lässt, so gross, dass nur eine der beiden denkbaren Formen entsteht.

Sofern während der Kondensation der Prolinrest (C-5) nicht racemisiert wurde [1], kann auf einheitliche Konfiguration am C-2 des Produkts (7) geschlossen werden:

- Da die chemischen Verschiebungen im NMR-Spektrum für Methylgruppen in 2-exo- oder 2-endo-Stellung erwartungsgemäss nicht identisch sind (vgl. NMR-Daten in Abschnitt 2.2.4), schliesst das scharfe Dublett der 2-Methylgruppe des Produkts (7) einen Anteil an 2-endo-Methylderivat aus.
- Hingegen ist es ungewiss, ob im NMR-Spektrum die enantiomeren Heterocyclen (Prolinrest racemisiert) unterschieden werden könnten:



L-Pro-



D-Pro-

4. Schlussfolgerung: Unter der Voraussetzung racemisierungsfreier Kondensation gilt die Struktur nach Formel p 48.

---

1) Der Prolinrest ist erfahrungsgemäss, wohl aufgrund seiner Ringstruktur, vor Racemisierung geschützt.

Anhang:

1. Im N,N'-Methylenderivat (8) des Tetrapeptidesters (6) ist das Alkyliden-C symmetrisch substituiert.

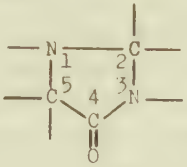
2. Für Kondensationsprodukte aus Peptiden ohne N-terminales Prolin muss die Diskussion wie folgt ergänzt werden, denn es bestehen hier neue Isomeriemöglichkeiten, sie betreffen:

a) die Bindung zwischen terminalem Stickstoff und Alkylidenkohlenstoff, wobei eine Iminstruktur (Schiff'sche Base) ausgeschlossen werden kann:
   - Die Produkte werden von Natriumborhydrid, welches eine C=N Bindung reduzieren würde, nicht angegriffen.
   - Schiff'sche Basen von gesättigten aliphatischen Carbonylverbindungen und Peptiden sind nur unter absolut wasserfreien Bedingungen beständig R e e v e s [74].

b) die Konfiguration am Alkylidenkohlenstoff, welche jetzt unabhängig ist von der Konfiguration am α-Kohlenstoff der N-terminalen Aminosäure:
   - Im N,N'-Isopropylidenderivat (9) des Hexapeptidesters (2) ist das Alkyliden-C symmetrisch substituiert.
   - Das N,N'-Aethylidenderivat (3a,b) lässt sich mittels Säulenchromatographie in 2 Isomeren (3a) und (3b) auftrennen, welche sich in Lichte unserer Experimente wahrscheinlich nur in der Konfiguration am Alkyliden-C unterscheiden (vgl. Abschnitt 3.3.2).

2.5 Bemerkungen zur Nomenklatur

2.5.1 Der Heterocyclus

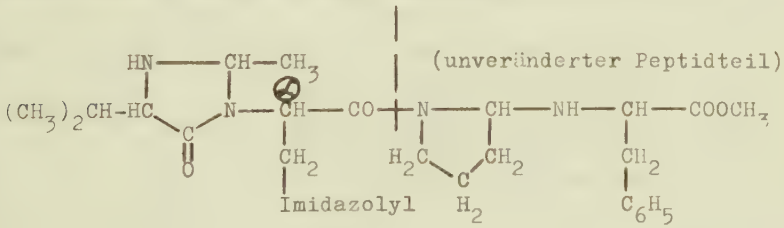


Nach den IUPAC-Regeln [77] ist ein solcher Heterocyclus als 4-Imidazolidinonderivat, bzw. Imidazolidin-4-on zu bezeichnen. (In der älteren Literatur findet sich dafür die Bezeichnung 4-Oxo-tetrahydroglyoxalin oder Imidazolidon.) Die Numerierung der Positionen beginnt am Amino-N und führt in der eingezeichneten Weise weiter. Im radikalischen Nomenklatursystem kann der gesamte Heterocyclus als 'Radikal' eingeführt werden. Die Verknüpfungsstelle wird als sogenannte yl-Funktion behandelt, beispielsweise Imidazolidin-4-on-3-yl-.

Der Spezialfall der Pyrrolo-imidazolon-Struktur aus Prolinpeptiden wurde bereits erwähnt (p 48).

2.5.2 Der Heterocyclus in Peptidderivaten

Systematisch würde man das Tetrapeptidderivat (5a,b):



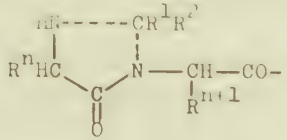
beispielsweise als N-(α-(5-Isopropyl-2-methyl-imidazolidin-4-on-3-yl)α-(imidazolyl-methylen)acetyl))-prolyl-phenylalanyl-methylester bezeichnen.

Hierbei müssen die Seitenketten, der am Imidazolidinring beteiligten Aminosäuren, detailliert notiert werden; die entstehungsmässig übersichtliche Dipeptidstruktur, welche dem Heterocyclus zugrundeliegt, kommt nicht zum Ausdruck. Wohl aus diesem Grunde werden die bisher in der Literatur beschriebenen 4-Imidazolidinone aus Peptiden zumeist als N,N'-Alkylidenderivate oder trivial (Aceton-Oxytocin) notiert.

Mit der Vermehrung der Beispiele dieser Stoffklasse wächst das Bedürfnis nach einer eindeutigen und zugleich einfachen Bezeichnungsweise. So sollte zwischen 'terminalen' und 'nichtterminalen' Imidazolidinonen unterschieden werden können, und die Bezeichnungen sollten sowohl den allgemeinen IUPAC-Regeln der organischen Chemie [77], wie auch den IUPAC-IUB-Regeln für Peptidderivate [78] genügen.

Die Schwierigkeiten bei der Uebertragung der Peptidschreibweise auf die Benennung der Imidazolidinone aus Peptiden rühren daher, dass die Peptidschreibweise das intakte Polyamidgerüst voraussetzt und dass Peptide nur in einer Richtung gelesen werden, nämlich vom Amino- zum Carboxylende hin. Von den Aminosäuren abweichende Bauelemente einer Kettenstruktur müssen als Einheiten zwischen eine Amidbindung 'eingeschoben' dargestellt werden:

Bei unseren Imidazolidinonen enthält das Aminosäure-fremde Bauelement E ein Dipeptidoylskelett:



Unter Berücksichtigung obiger Erwägungen schlagen wir eine Bezeichnungsweise vor, welche der Peptidherkunft unserer Imidazolidinone gerecht wird, und es durch Einführung eines einzigen Zusatzsymbols gestattet, bei der formelmässigen Darstellung, die abgekürzte Peptidschreibweise zu benützen. Wir bezeichnen das Strukturelement E als (N,N'-Alkyliden-dipeptidoyl-) und fügen es in die, mit ihm verbundene Aminosäuresequenz ein. Besitzt der betroffene Dipeptidoylrest mehr als zwei Stickstoffatome, so können diese indiziert werden. Aus (5a,b) wird somit:

(N_α,N'_α-Aethyliden-valyl-histidyl)-prolyl-phenylalanyl-methylester

Aus Val-His- wird im Imidazolidinon mit unserem Zusatzsymbol $|^{CRR'}|$ für die N,N'-Alkylidengruppe, in folgerichtiger Ergänzung der IUPAC-IUB-Symbolik für Substitution am N_α von Aminosäureresten [78]: $|^{CRR}|_{Val}|_{His-}$

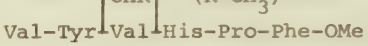
Aus (5a,b) wird abgekürzt: $|^{CHR}|_{Val}|_{His-Pro-Phe-OMe}$ (R=CH_3)

bzw: $H|^{CHR}|_{Val}|_{His-Pro-Phe-OMe}$ (R=CH_3)

Auch 'nichtterminale' N,N'-Alkylidenderivate lassen sich eindeutig bezeichnen:

Valyl-tyrosyl-(N_α,N'_α-äthyliden-valyl-histidyl)-prolyl-phenylalanyl-methylester

wird abgekürzt:



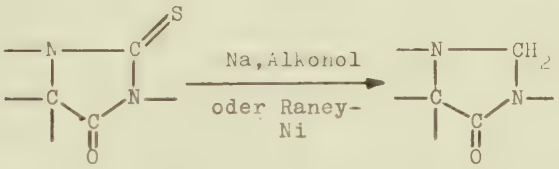
Im Text besteht oft das Bedürfnis nach Kurzbezeichnungen. In der vorliegenden Arbeit benützen wir:

Imidazolidinon.....	für das ganze Molekül
Alkyliden.....	für die involvierte Carbonylverbindung
(n) Peptid.....	für den involvierten Peptidteil aus n Aminosäuren
(n-2) Peptid.....	für die Kennzeichnung des Restpeptids

3. GEZIELTE SYNTHESE DER 4-IMIDAZOLIDINONE AUS PEPTIDEN

3.1 Allgemeines zur Synthese des 4-Imidazolidinonringes

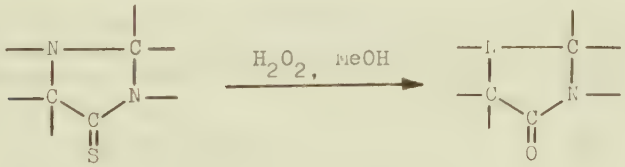
4-Imidazolidinone finden in der Literatur nur sporadisch Erwähnung, im Gegensatz zu den häufig beobachteten 2-Imidazolidinonen (Harnstoffderivate) und den Imidazolidin-2,4-dionen (Hydantoinderivate). Unseres Wissens ist bisher keine Zusammenfassung zur Chemie der 4-Imidazolidinone erschienen. Besser bekannt sind seit langem die analogen Thio-Verbindungen. So ist es kein Zufall, dass die Desulfurierung eines 2-Thiohydantoins durch B i l t z [82] die erste, uns bekannt gewordene, Synthese eines 4-Imidazolidinons darstellt:



B i l t z [82], E d w a r d [71], C a r r i n g t o n [84], F r e t e r [70], S t a n e k [83]

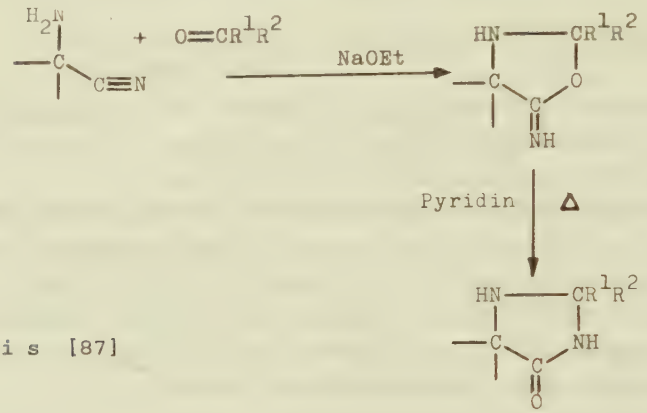
Weitere Synthesen:

a) Desulfurierung von Imidazolidin-4-thionen:



F e r r i n i [85], A s i n g e r [86]

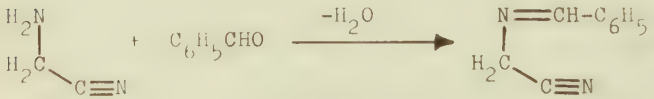
b) Kondensation von α-Aminonitrilen mit Carbonylverbindungen:



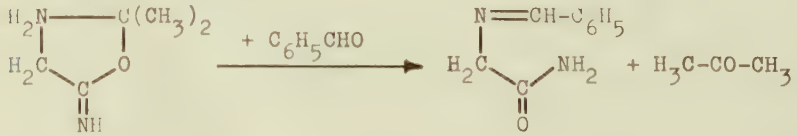
D a v i s [87]

Kommentar:

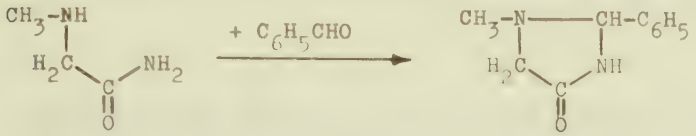
Man hat in diesem Zusammenhang die Frage diskutiert, d u V i g n e a u d et al. [138], ob die Kondensation zum Imino-oxazolidin, resp. Imidazolidinon über eine primär gebildete Schiff'sche Base verlaufe. In der Tat isoliert man eine Schiff'sche Base aus Benzaldehyd und Aminoacetonitril, die indessen nicht zur Cyclisierung gebracht werden kann [87]:



Auch von 2,2-Dimethyl-5-imino-oxazolidin ausgehend, entsteht mit Benzaldehyd, durch Verdrängung des Acetons, die Schiff'sche Base des Aminoacetamids; auch diese Schiff'sche Base ist nicht cyclisierbar [87]:

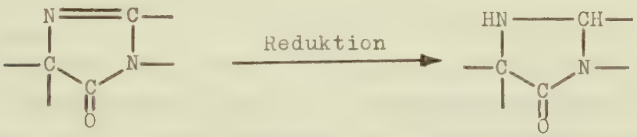


Andererseits führt Benzaldehyd zur Cyclisierung, sobald man durch Methylierung am Aminostickstoff die Ausbildung einer Schiff'schen Base verhindert [87]:



Diese Resultate sind zwanglos erklärbar, wenn man annehmen will, dass die Elektrophilie des Imin-C durch einen benachbarten aromatischen Rest in gleicher Weise herabgesetzt wird, wie die Elektrophilie eines Carbonyl-C. Benzylidenimine sind beständiger als Alkylidenimine; bei letzteren genügt die Elektrophilie für die Reaktion mit Amid-N oder Amid-O zur Imidazolidinon- resp. Oxazolidin-Bildung. Erzwingt man die Ausbildung einer Benzylidenimmoniumform an Stelle eines Benzylidenimins, so erhöht man dadurch die Elektrophilie des Benzyliden-C und es cyclisieren jetzt auch die Derivate aromatischer Carbonylverbindungen. Dies kann dadurch erreicht werden, dass man an Stelle eines primären Amins, ein sekundäres Amin mit Benzaldehyd umsetzt.

c) Reduktion von Imidazolonen:

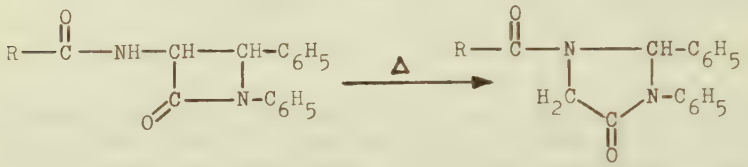


S c h i p p e r [88], O s a m u [76]

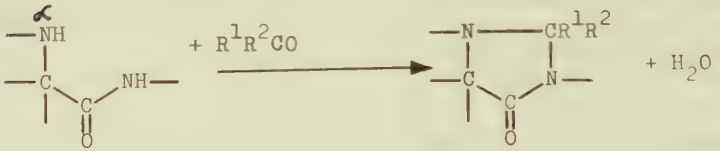
Die Imidazolone wurden hergestellt mittels Ringschluss von α-Amidinosäuren R i e d [89], mittels Kondensation von Orthoestern mit α-Aminosäureamiden S c h i p p e r [88], F r e t e r [70], B r u n k e n [90], oder mittels Kondensation von α-Aminosäureamiden und Formamid S c h i p p e r [88].

d) Umlagerung von Azetidinen:

Die Reaktion wurde erstmalig an einem Penicillinderivat beobachtet [91], später auf einfachere Azetidinon-derivate übertragen B i r d [92]:



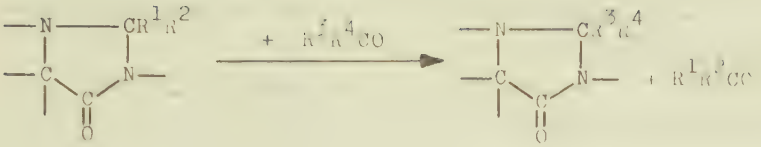
e) Kondensation von α-Aminosäureamiden mit Carbonylverbindungen (ohne Berücksichtigung der eigentlichen Peptidderivate):



D a v i s [87], verschiedene Patente [93][94][95]

Die Aminogruppe kann auch geschützt sein, die Kondensation erfordert dann schärfere Bedingungen und saure Katalyse:
(N_α-Benzyloxycarbonyl-) Z e h a v i [41]
(N_α-(p-Chloro-benzoyl)-) Patent [95]

f) Austausch des Alkylidenrestes in 4-Imidazolidinonen (sog. Umalkylierung):



Unter bestimmten Bedingungen gelang der Austausch des N,N'-Alkylidenrestes gegen einen anderen. Er erfolgt zweifellos unter Ringöffnung und erneuter Kondensation mit dem zugesetzten Carbonylderivat; Wasser wirkt katalytisch. Je nach dem Substitutionsgrad des 4-Imidazolidinons und den Eigenschaften der Carbonylverbindung (Sdp., aromatisch oder aliphatisch) können noch verschiedene andere Kondensationsprodukte entstehen, man orientiere sich bei D a v i s [87].

In der Reihe der Imidazolidin-4-thione wurde die 'Umalkylierung' zu präparativen Zwecken mit Erfolg angewendet A s i n g e r [86].

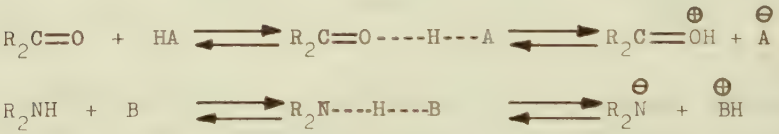
Für die Synthese von Imidazolidinonen aus Peptiden eignen sich nur die beiden zuletzt genannten Verfahren e) und f). Ausser zu den gewünschten Imidazolidinonen, können Carbonylverbindungen mit Peptiden aber zu diversen andersartigen Produkten reagieren. Im folgenden Abschnitt 3.2 versuchen wir, die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten systematisierend zusammenzufassen.

3.2 Reaktionsmöglichkeiten zwischen Aminosäurederivaten und Carbonylverbindungen

3.2.1 Reaktionstypen

Das Geschehen wird dominiert durch die Reaktionen der Carbonylkomponenten mit den Aminogruppen des Peptids. Die reversible Addition einer Aminogruppe an die Carbonylverbindung zum α-Aminocarbinol ist der fundamentale Schritt aller Amin-Carbonyl-Reaktionen:

Die Reaktion unterliegt allgemeiner Säure- und Basenkatalyse, Carbonylgruppen können durch Säuren, Amine durch Basen aktiviert werden:

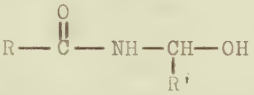


Die Gleichgewichtslage für die α-Aminocarbinolbildung ist von den elektronischen und sterischen Einflüssen der Substituenten des Amins sowie der Carbonylverbindung abhängig. In einer neuesten Uebersicht stellt O g a t a [96] die experimentellen Tatsachen vor und deckt Zusammenhänge auf.

α-Aminocarbinole sind im allgemeinen zu unstabil um isoliert zu werden, vergleichbar etwa den Halbacetalen oder gem-Diolen. Die Basizität des Stickstoffs ist in α-Aminocarbinolen stark vermindert ($\triangle$ pK ca. 2-3, vgl. L e v y [97], K a l l e n [98]). Von der reduzierten Basizität der N-Alkylole machte man

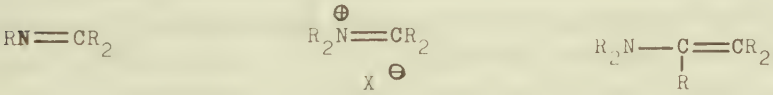
schon lange Gebrauch bei der sogenannten Formoltitration S ö r e n s e n [99], bei welcher durch Zugabe von Formalin zur Lösung einer Aminosäure die Titrationskurve verändert wird, sodass sich die Aminosäure bei der Titration mit Base wie eine einfache Monocarbonsäure verhält.

Das tetragonale α-C der α-Aminocarbinole (vorgängig Carbonyl-C) ist nurmehr sehr wenig elektrophil, vergleichbar etwa einem Acetal. Beispielsweise reagieren die isolierbaren α-Amidcarbinole:



selbst in basischem Milieu, nicht mehr mit Aminen F r a e n k e l - C o n r a t [100].

α-Aminocarbinole reagieren zu den verschiedensten stabileren Produkten weiter. Formal können die Folgereaktionen als Abspaltung von Wasser verstanden werden; intramolekular zur Schiff'schen Base, zum Immoniumsalz oder zum Enamin:



inter- oder intramolekular mit sämtlichen aciden Protonen zu einer Fülle von Verbindungstypen, allgemein:

Uebersichten zu diesen, oft als Aminoalkylierungen referierten

Reaktionen, finden sich bei O g a t a [96], W a g n e r [22], S p r u n g [101].

Bei den Aminoalkylierungen stellt sich die Frage nach der Art des reaktiven Zwischenproduktes, welches dem Angriff des Nucleophils X unterliegt:

α-Amino-carbinol | Imin | Immonium | Carbonium

α-Aminocarbinole können nicht als Elektrophile betrachtet werden, da bekannt ist, dass die Additionen am α-C nicht durch nucleophile Substitution, sondern durch Eliminations-Additionsprozesse (d.h. über Imine oder Immoniumderivate) erfolgen.

Imine (Schiff'sche Basen, Azomethine) reagieren mit diversen Nucleophilen ähnlich wie Carbonylverbindungen; oft sind die Additionen Säure-katalysiert.

Die reaktivste Spezies wird zweifellos durch die Immoniumderivate repräsentiert, welche entstanden sein können durch Wasserabspaltung aus einem Carbonylderivat und einem sekundären Amin, oder durch Protonierung eines Imins. Die Unterschiede in der Reaktivität gegen Nucleophile zwischen geladener und ungeladener C-N-Doppelbindung zeigen sich, unter anderem, bei der Hydrolyse von Iminen. Die Hydrolysegeschwindigkeit nimmt proportional zur Konzentration an konjugierter Säure des Imins (Immonium) zu (H^+-Katalyse), während Hydroxylionen die Iminhydrolyse nicht katalysieren, da sie die aktive Immoniumspezies zerstören und am Imin selbst nicht wirksam genug nucleophil angreifen können C o r d e s [102]. Die aus sekundären Aminen leicht entstehenden Immoniumsalze hingegen reagieren rasch

mit Hydroxylionen zu Carbinolaminen R e i b e r [103].

3.2.2 Beispiele an Aminosäurederivaten

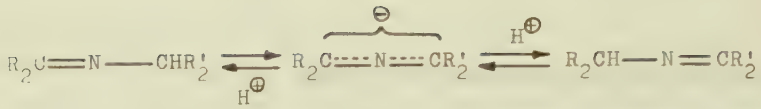
In der Literatur finden sich Beispiele, welche zeigen, dass alle im vorigen Abschnitt erwähnten Reaktionstypen auch mit Aminosäure- und Peptidderivaten als Aminkomponenten möglich sind.

Schiff'sche Basen (Imine)

Imine aus gesättigten aliphatischen Carbonylverbindungen und Aminosäuren oder Peptiden erwiesen sich als unbeständig, die Imine aus aromatischen Aldehyden hingegen konnten isoliert werden G e r n g r o s s [104]. Die Stabilität der Imine nimmt zu, wenn die Möglichkeit der Bildung von intramolekularen H-Brücken zum Imin-Stickstoff besteht, z.B. in ortho-Hydroxynaphtaldehydderivaten. Imine aus aromatischen ortho-Hydroxyaldehyden fanden Anwendung als Schutzgruppen in Peptidsynthesen S h e e h a n [105].

Protonierte Imine können unter dem Einfluss von Base zu Enaminen isomerisieren, wie dies H i n e [120] mittels Isotopenaustauschexperimenten quantitativ verfolgen konnte:

Eine weitere bekannte Reaktion der Imine, auch diese unter dem katalytischen Einfluss von Base, finden wir in der Prototropie zum isomeren Imin über ein Resonanz-stabilisiertes Carbanion:



(vgl. zum Mechanismus C r a m [107])
Die Reaktion, welche im Falle optisch aktiver α-C zur Racemisierung führt, wird durch Imidazol spezifisch katalysiert B r u i c e [106] [1].

Kondensation einer Carbonylverbindung mit einem Amin zum Iminderivat, Isomerisierung zum Imin mit verschobener Doppelbindung und anschliessende Hydrolyse des isomeren Imins kennzeichnen eine, als 'Transaminierung' bezeichnete, Reaktionsfolge von grosser biochemischer Bedeutung. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Desaminierung von α-Aminosäuren zu α-Ketosäuren durch Pyridoxal.

Enamine

Enamine isomerisieren in Gegenwart von Säure durch Protonierung am β-Kohlenstoff zur Immoniumform, welche rasch hydrolysiert wird:

(Zur Frage der Basizität und des Hydrolysemechanismus der Enamine, vgl. S o l l e n b e r g e r [108].)
Ausnahmen bilden die endocyclischen, konjugierten Enamine aus

---

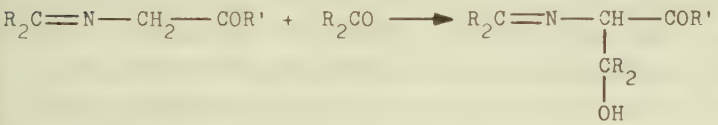
1) Erstaunlicherweise können Schiff'sche Basen aus Benzaldehyd und Aminosäuren mit wässrigem Natriumhydroxid behandelt werden ohne dass die Aminosäure racemisieren würde (Syntheseschritt bei der Herstellung von optisch reinen N-Methyl-Aminosäuren Q u i t t [139]).

Dimedon und Aminosäureestern:

Die Dimedonyl-Schutzgruppe scheint die gegen saure Hydrolyse stabilste N-Schutzgruppe darzustellen! H a l p e r n [109].

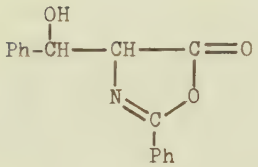
Kondensationen mit α-C von Aminosäuren

Durch die benachbarte C-N-Doppelbindung wird im Imin eines Aminosäurederivats die bereits bestehende Aktivierung des Protons am α-C (durch Carboxyl- oder Esterfunktion) verstärkt. Mit Base entsteht ein Carbanion, welches leicht mit freier, oder als Iminderivat aktivierter Carbonylkomponente zu β-Hydroxy-aminosäurederivaten kondensiert:

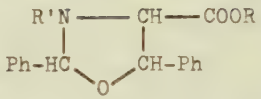


Die Kondensation geht besonders leicht mit der CH_2-Gruppe von Glycinderivaten. Dabei ist es von der Struktur der Carbonylkomponente (Substitutionsgrad, aromatisch, aliphatisch), der Art des Aminosäurederivats (Amino- oder Carboxyl-Schutzgruppen), sowie den Reaktionsbedingungen abhängig, welche β-Hydroxy-aminosäurederivate isoliert werden, da sich weitere Kondensationsschritte, eventuell auch Hydrolysen anschliessen können.

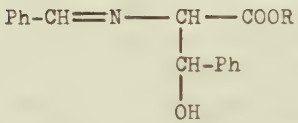
Beispiele: (Ph- = Aromat)



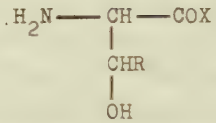
H a v i n g a [110]



S p i t z e r [111]
B e r g m a n n [112]



H a v i n g a [110]
B e r g m a n n [112]



W i e l a n d [113]

Kondensationen mit diversen funktionellen Gruppen (ohne Amid)

In den Carbonyl-Amin-Addukten (α-Aminocarbinol, Imin, Immoniumsalz) betätigt sich das ursprüngliche Carbonyl-C als elektrophiles Zentrum in den als Aminoalkylierungen bezeichneten Reaktionen. (Manche der im folgenden erwähnten Kondensationen wurden mit Formaldehyd durchgeführt. Oft sind auch die entsprechenden Reaktionen mit anderen Carbonylverbindungen bekannt.)

Die Carboxylgruppe von Aminosäuren und Benzyloxicarbonyl-Aminosäuren beteiligt sich an der Carbonyl-Fixierung unter Bildung von Oxazolidinonen, welche als Carboxyl-aktivierte Derivate in Peptidsynthesen eingesetzt wurden:

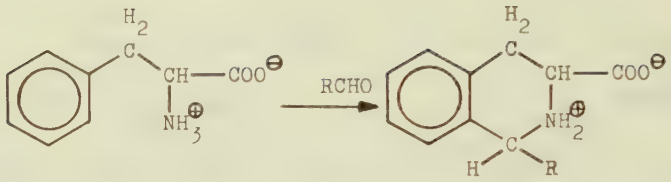
Ben Ishai [114], Micheel [115], Dane [140]

Die Hydroxylgruppe von Serin gibt bei der Umsetzung mit Aldehyden Anlass zur Bildung von Oxazolidinen, Cystein zu analogen Thiazolidinen French [116]. In Uebereinstimmung mit den bekannten Eigenschaften der α-Aminoäther und α-Aminothioäther Smith [117], erweisen sich die Thiazolidine stabiler als die Oxazolidine.

Ungeschützte Aminogruppen reagieren mit Carbonyl-Amin-Addukten leicht zu gem-Diaminen. Diese sind in alkalischem Milieu stabil, disproportionieren aber beim Erwärmen oder mit saurer Katalyse zu Amin und reaktiver Immoniumverbindung, welche rasch hydrolysiert wird. Da im übrigen bekannt ist, dass gem-Diamine unter basischen Bedingungen die Rolle des aminoalkylierenden Reagens in Mannich-Reaktionen (anstelle des Immoniumions) übernehmen können Burckhalter [118], sind sie eher als reaktive Zwischenprodukte denn als Endprodukte der Amin-Carbonyl-Kondensationsreaktionen zu bewerten.

Die aromatischen Ringe von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin können nach Art der Mannich-Kondensation intermolekular aminoalkyliert werden Fraenkel-Conrath [119]. Die Derivate dieser Aminosäuren mit ungeschützter Aminogruppe können intramolekular analog reagieren French [116].

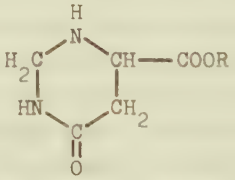
Beispiel:



Kondensationen mit Amidgruppen

(Einschliesslich Kondensation von Peptiden zu 4-Imidazolidinonen)

Primäre Amidgruppen $-CO-NH_2$ (Asparagin, Glutamin) reagieren gut mit aminoalkylierenden Reagenzien zu N,N'-Alkylidenderivaten, wie dies von F r a e n k e l - C o n r a t [100] an Proteinen nachgewiesen worden war. Entsprechend reagiert Asparagin intramolekular mit Formaldehyd zum Tetrahydropyrimidinderivat:

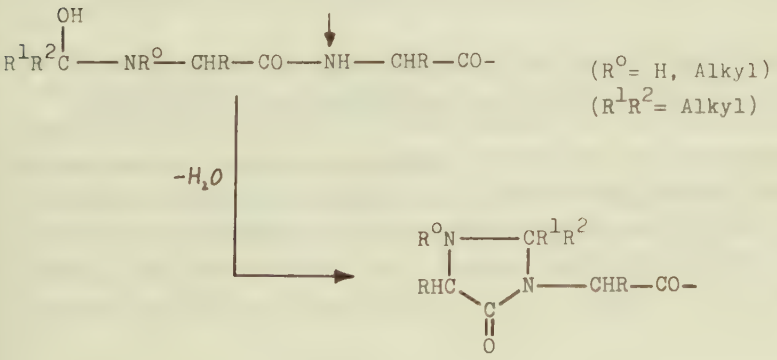


F r e n c h [116]

Nach den grundlegenden Arbeiten von E i n h o r n [121] glaubte man annehmen zu dürfen, dass N-Alkyl-substituierte Amide gegen aminoalkylierende Reagenzien (Mannich) recht wenig reaktiv seien. In einer neueren Monographie zur Aminoalkylierung von H e l l m a n n [122] findet man bestätigt, dass die Aminomethylierung von N-Alkyl-Amiden auf wenige Ausnahmen beschränkt sei. Für Aminosäure- und Peptidderivate führten die Untersuchungen von F r a e n k e l - C o n r a t

[100] zu denselben Ergebnissen; primäre Amid-N konnten aminomethyliert werden, nicht aber die substituierten Amid-N der Peptidbindungen. Die Versuche von Z e h a v i [41] wiesen in dieselbe Richtung. Seine 4-Imidazolidinon-Synthese, ausgehend von Cbo-Aminosäureamiden und Carbonylverbindungen, ergaben schon bei N-Methyl-Amiden nur noch schlechte Ausbeuten. Die Möglichkeit von Methylenbrücken zwischen Amin-N und Peptid-N (intramolekulare Aminomethylierung) wurde zwar schon von F r e n c h [116] postuliert; ein entsprechender Strukturbeweis ist indessen nie erbracht worden. Die Reaktivität der substituierten Amidgruppe gegen Formaldehyd schien sich auf die Bildung von relativ stabilen Methylol-Amiden (bei hohem pH) zu beschränken F r a e n k e l - C o n r a t [100], S a i d e l [123].

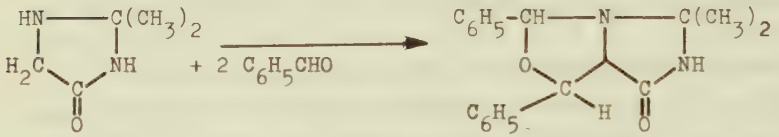
Es war deshalb eine eigentliche Ueberraschung, als H a r d c a s t l e [43] an einem Peptidderivat der Penicillansäure, und kurz danach die Arbeitsgruppe von d u V i g n e a u d [42] an Oxytocin die Bildung von 4-Imidazolidinonen nachweisen konnten, welche mit Aceton unter mildesten Bedingungen erhalten worden waren. Ihre Entstehung kann man sich nicht anders als durch α-Aminoalkylierung eines Amid-N vorstellen:



Die nach unserer oxidativen Methode mit Pd/O_2 erhaltenen 4-Imidazolidinone von Tetra- und Hexapeptiden (vgl. Zusammenstellung p 8) zeigen nun, dass diese Kondensationsreaktion nicht auf Aceton als Carbonylkomponente beschränkt ist, und sich auf Peptide unterschiedlicher Grösse und Aminosäurenzusammensetzung anwenden lässt.

Von einfachen 4-Imidazolidinonen ist bekannt, dass sie mit Carbonylverbindungen unter Umständen weiteren Kondensationsreaktionen unterliegen. Wir haben diese Möglichkeit bei unseren Peptidderivaten nicht untersucht.

Beispiel:



D a v i s [87]

3.3 Rationale Synthese der 4-Imidazolidinone aus Peptiden

3.3.1 Einfluss von Pd-Kohle und NEt_3 auf die Kondensation mit Acetaldehyd und Acetal in verschiedenen Lösungsmitteln

Die Entstehung von 4-Imidazolidinonen unter dem Einfluss von Pd-Kohle, Sauerstoff und NEt_3 in Alkohol (vgl. Abschnitt 1) kann im einfachsten Fall als Folge zweier unabhängig ablaufender Reaktionen gedacht werden; der Oxidation von NEt_3 oder Alkohol zu Acetaldehyd und der Kondensation der freien Carbo-

nylverbindung mit dem Peptid. Es erscheint aber durchaus möglich, dass die beiden Reaktionen nicht unabhängig voneinander sind, und da wir uns in diesem Abschnitt mit der eigentlichen Kondensation befassen wollen, seien einige naheliegende Interferenzmöglichkeiten des 'Oxidationssystems' diskutiert:

Es schien ungewiss, ob die Carbonylkomponente als freie Carbonylverbindung reagieren würde. In absolutem Alkohol ist die direkte Bildung von Acetal (durch Solvolyse der primären Oxidationsprodukte von NEt_3 entstanden) wahrscheinlicher. Es ist auch denkbar, dass ein Oxidationsprodukt des NEt_3 (beispielsweise das entsprechende Immoniumderivat), vorgängig einer Solvolyse, bereits mit dem Peptid reagiert. Im Gemisch von primärem Amin (Peptid), sekundärem Amin (Et_2NH), Alkohol (Lgm) und Acetaldehyd (Oxidationsprodukt) muss mit dem Auftreten meherer Additions- und Solvolyseprodukte gerechnet werden, welche in verschiedenem Ausmass zur Reaktion mit dem Peptid befähigt sind (vgl. Abschnitt 3.2.1).

Pd^0 und Pd-Ionen sind gute Komplexbildner. Es ist nicht auszuschliessen, dass das Peptid oder ein Zwischenprodukt der Kondensation (z.B. das α-Carbinolamin) mit Pd koordiniert. Komplexbildung könnte die Geschwindigkeit der einzelnen Kondensationsschritte verändern und die stereoselektive Synthese am asymmetrischen Alkyliden-C begünstigen.

Der als Lösungsmittel zugesetzte Alkohol ist nicht nur als 'Verdünnungsmittel' zu betrachten. Durch Solvolyse kann beispielsweise, statt eines α-Carbinolamins als Zwischenprodukt der Kondensation, ein α-Aminoäther entstehen. Als polares, protisches Lösungsmittel stabilisiert Alkohol geladene Zwischenprodukte, beispielsweise die sehr reaktiven Immoniumionen.

Um den Einfluss der vorerwähnten Faktoren etwas abzuschätzen, haben wir die Wirkung verschiedener Lösungsmittel und Zusätze auf die Kondensation eines Peptids mit Acetaldehyd oder mit Diäthylacetal geprüft. Als Testpeptide wählen wir die Tetrapeptidester (6) und (4), welche mit Acetaldehyd zu den N,N'-Aethylidenderivaten (7), respektive (5a,b) kondensieren.

Die Konzentrationen werden ähnlich den Versuchen mit Pd-Kohle, Triäthylamin und Sauerstoff gewählt (Abschnitt 1.1.2); Oxidationsprozesse werden jedoch durch konsequentes Fernhalten von Sauerstoff mittels Stickstoff unterdrückt. Die Ansätze enthalten Peptidester zu ca. 0.02 Mol pro l und einen einfachen Ueberschuss Acetaldehyd, sowie allfällige weitere Zusätze. Nach 1-2 h bei 25°C sowie nach weiteren 2 h Reaktionszeit bei 55°C werden Proben chromatographiert. In paralellen Versuchen kann der Umsatz mittels DC abgeschätzt werden.

Wir finden folgende Ergebnisse:

- In absolutem oder 80-proz. Aethanol ist die Kondensation mit Acetaldehyd bei 55°C in 1 h praktisch vollständig, während in Chloroform nur Spuren des 4-Imidazolidinons nachgewiesen werden. Tetrapeptidester (6) ist in Wasser oder Benzol unlöslich, weshalb die Reaktion in diesen Lösungsmitteln nicht verfolgt werden kann. Der wasserlösliche Peptidester (4) hingegen lässt sich auch in Wasser mit Acetaldehyd fast vollständig zum N,N'-Aethylidenderivat (5a,b) umsetzen.
- Ein Zusatz von 0.5 Gew.T. Pd-Kohle (10-proz.) oder 5 Gew.T. NEt_3, oder die Kombination beider Zusätze bewirken keine beobachtbare Veränderung hinsichtlich Geschwindigkeit und Ausmass der Produktbildung.
- Bei 25°C finden sich nach 2 h in allen Ansätzen höchstens kleine Anteile der 4-Imidazolidinone.

Wir schliessen aus diesen Beobachtungen, dass Pd-Kohle und NEt_3 auf die Kondensation der Peptidester mit Acetaldehyd keinen merklichen Einfluss haben.

- Ein Zusatz von 5 Gew.T. Essigsäure verlangsamt die Reaktion beträchtlich (Umsatz nach 1 h, 55°C ungefähr ein Viertel); ein ebensolcher Zusatz von p-Toluolsulfosäure verhindert sie. Es ist anzunehmen, dass die Aminogruppe durch Protonierung geschützt wird. (Im Falle des Essigsäurezusatzes muss berücksichtigt werden, dass die Hydrolyse der 4-Imidazolidinone bei pH 4-5 noch rasch erfolgt, während sie in stark saurem Milieu unterdrückt wird.)
- Wird anstelle von Acetaldehyd dessen Diäthylacetal eingesetzt, so finden sich unter den getesteten Bedingungen in keinem Fall die gesuchten 4-Imidazolidinone; die Peptidester bleiben unverändert.

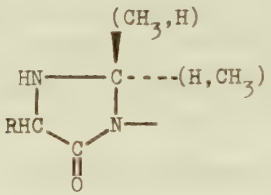
Hieraus schliessen wir, dass Acetal, sofern es unter den oxidativen Verhältnissen mit Pd-Kohle und Sauerstoff entsteht, bei unseren Reaktionsbedingungen nicht zur Kondensation mit Peptiden befähigt ist.

3.3.2 Kondensation einiger Peptidester mit Acetaldehyd, Formaldehyd oder Aceton zu 4-Imidazolidinonen

Die vorstehenden Versuche haben gezeigt, dass Pd-Kohle auf das Ergebnis der Kondensation eines Peptids mit Acetaldehyd ohne Einfluss ist, und dass Acetaldehyd nicht durch Diäthylacetal ersetzt werden kann. (Die Verwendung von Acetal anstelle von Acetaldehyd (luftempfindlich, Sdp. 20°C), wäre experimentell vorteilhaft gewesen.) Wir haben deshalb versucht, die 4-Imidazolidinone, welche wir erstmals unter der Einwirkung von Pd-Kohle, Sauerstoff, NEt_3 erhalten hatten, durch Kondensation der entsprechenden Peptidester mit Acetaldehyd in wässrig-alkoholischer Lösung zu synthetisieren. Dies gelingt gut mit den Peptidestern:

Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (2) ⟶ (3a,b)
Val-His-Pro-Phe-OMe (4) ⟶ (5a,b)
Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (6) ⟶ (7)

Dabei bestätigt sich eine frühere Vermutung, dass nämlich bei der Kondensation mit Aldehyden im allgemeinen die beiden möglichen Epimeren, welche sich in der Konfiguration am N,N'-Alkyliden-C des 4-Imidazolidinon-Ringes unterscheiden, entstehen:



Im Spezialfall des Prolin-endständigen Peptids (6) bildet sich stereoselektiv nur ein Produkt (7). Wir haben uns über die Ursache dieser Selektivität bereits an anderer Stelle (p 31,45) geäussert.

Die isomeren N,N'-Aethylidenderivate können mittels DC aufgetrennt werden. Im Falle der Derivate (3a,b) des Hexapeptidesters (2) gelingt die Uebertragung der Trennung auf Kieselgelsäulen und es können Fraktionen der einzelnen Isomeren (3a) und (3b) isoliert werden, welche nur wenig mit dem anderen Isomeren verunreinigt sind, wie die Kontrolle mittels DC zeigt. Die IR-Spektren der Isomeren sind identisch. Die spezifische Drehung der Isomeren ist innerhalb der Fehlergrenze von $\pm 2^{\circ}$ gleich derjenigen des Gemisches.

Um die Nachteile schlecht auftrennbarer Isomerengemische zu umgehen, haben wir versucht, die homologen Verbindungen mit Formaldehyd oder Aceton, d.h. die N,N'-Methylen- respektive

N,N'-Isopropylidenderivate zu gewinnen. Dabei treten beträchtliche Unterschiede in der Reaktivität der verschiedenen Peptide gegen die eingesetzten Carbonylverbindungen zu Tage.

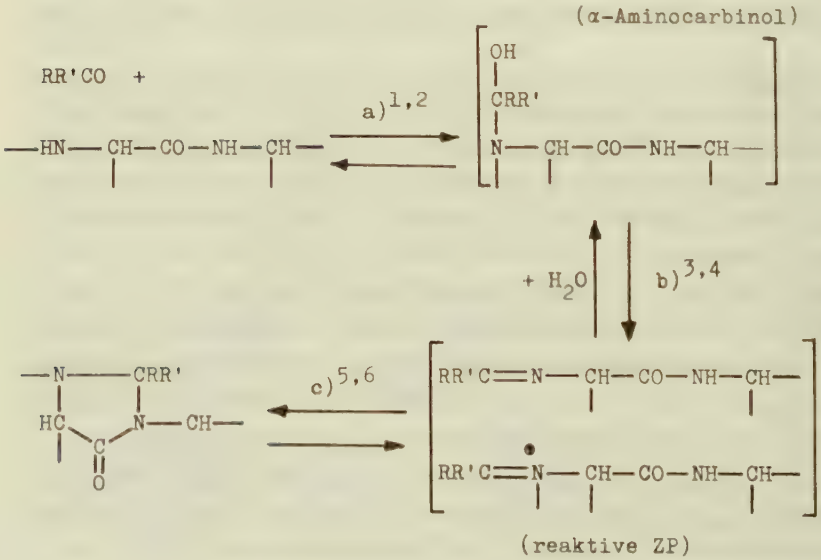
Formaldehyd, in gleichem Mol-Verhältnis und unter gleichen übrigen Bedingungen anstelle von Acetaldehyd eingesetzt, zeitigt nur bei Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (6) Kondensation zum N,N'-Methylenderivat (8), welches mittels DC vom Aethylidenderivat (7) unterschieden werden kann. Val-His-Pro-Phe-OMe (4) wie auch Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (2) liessen mit Formaldehyd keinerlei Produktbildung erkennen. Auf den Chromatogrammen waren die Eduktflecken in Gegenwart von Formaldehyd verschleppt, wie dies für labile Produkte, welche unter den Bedingungen der DC nicht stabil sind, typisch ist. Wir sehen hier die Erklärung dafür, dass bei der Synthese im System Pd-Kohle, Sauerstoff, NEt_3, Methanol - mit Ausnahme des Tetrapeptidesters (6) - kein Methylenderivat isoliert werden kann, obwohl in den Reaktionsgemischen stets beträchtliche Mengen Formaldehyd (aus Methanol) vorhanden sind (vgl. Tabelle p 16).

Mit Aceton, in grossem Ueberschuss als Lgm verwendet, (dieselben Bedingungen erlaubten H r u b y [42] die Synthese verschiedener N,N'-Isopropylidenderivate der Oxytocin-Reihe), lässt sich aus Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (2) in guter Ausbeute das einheitliche 2,2-Dimethyl-imidazolidin-4-on-derivat (9) herstellen. Das Imidazolidinon (9) kann mittels DC knapp von den N,N'-Aethylidenderivaten (3a) und (3b) unterschieden werden. Unter denselben Reaktionsbedingungen entstehen mit Val-His-Pro-Phe-OMe (4) keine, seinen N,N'-Aethylidenderivaten (5a,b) ähnlichen Produkte. Wird die Reaktionsdauer aber um ein Vielfaches verlängert, so weist eine Kontrolle mit DC auf das Vorliegen von mindestens fünf verschiedenen Produkten, auf deren Auftrennung und Analyse verzichtet wurde. Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (6) wird durch Aceton nicht verän-

dert, auch lange Reaktionszeiten und der Zusatz eines Trocknungsmittels (Molekularsieb) ergeben keine Produktbildung. Aus Pro-Leu-Gly-NH_2 hatte H r u b y [42] das N,N'-Isopropylidenderivat erhalten können, welches allerdings durch Kontakt mit kaltem Wasser sofort hydrolysiert wurde. (Zum Einfluss des N-terminalen Prolins vgl. p 44)

Das unterschiedliche Verhalten eines speziellen Peptids gegen verschiedene Carbonylverbindungen, oder einer bestimmten Carbonylverbindung gegen verschiedene Peptide lässt sich nicht mit einem einzelnen Argument begründen. Versuchen wir dennoch die empirischen Ergebnisse zu rationalisieren!

Für die Kondensation, welche zu 4-Imidazolidinonen führt, müssen wir mindestens drei Reaktionsschritte postulieren (vgl. Abschnitt 3.2.1):



[1] $CH_2O > CH_3CHO > CH_3COCH_3 >$ weniger elektrophil

[2] Gleichgewichtskonstante stark von der Struktur der Aminosäure abhängig F r e n c h [116]

[3] $CH_3COCH_3 > CH_3CHO > CH_2O >$ geringere Stabilisierung der Immonium-Carboniumform

[4] Einfluss der Peptidstruktur auf diesen Reaktionsschritt unbekannt

[5] Ringschluss durch grössere Substituenten evtl. erschwert; gem-Dimethylgruppen können andererseits durch konformative Einflüsse die Tendenz zur Ringbildung erhöhen

[6] Eine Uberstruktur des Peptids kann die terminale Amidgruppe beanspruchen und so den Ringschluss erschweren

Schon einfache Abschätzungen (1-6) lassen in der Reihe CH_2O, CH_3CHO, CH_3COCH_3 gegenläufige Tendenzen für die Reaktivität in den Teilreaktionen der Kondensation erwarten. Unsere experimentellen Ergebnisse weisen dahin, dass Acetaldehyd für die Kondensation mit Peptiden zu 4-Imidazolidinonen die reaktivste Carbonylkomponente darstellt. Acetaldehyd hat bisher in allen Fällen unter milden Bedingungen zu 4-Imidazolidinonen reagiert, während Aceton sich nicht mit allen Peptiden wie gewünscht umsetzte, und für Formaldehyd unter unseren Bedingungen die Bildung von 4-Imidazolidinonen auf einen Einzelfall beschränkt blieb. Eine Schwierigkeit bei der Verwendung von Acetaldehyd liegt darin, dass bei der Kondensation im allgemeinen ein neues Asymmetriezentrum entsteht. Die Auftrennung der diastereoisomeren Produkte dürfte mit zunehmender Peptidgrösse schwieriger werden. Wir schliessen nicht aus, dass die Kondensation durch schärfere Reaktionsbedingungen auch in den renitenten Fällen hätte erzwungen werden können. Schärfere Reaktionsbedingungen begünstigen aber auch unerwünschte Nebenreaktionen (vgl. Abschnitt 3.2.2), wie dies am Beispiel der versuchten Kondensation von Val-His-Pro-Phe-OMe (4) mit Aceton demonstriert worden ist.

In Aminoalkylierungsreaktionen gilt allgemein Formaldehyd als die reaktivste Carbonylverbindung. Dass Formaldehyd mit Peptiden nicht leicht zu 4-Imidazolidinonen reagiert, mag mit eine Ursache dafür sein, dass diese Peptidderivate solange nicht entdeckt wurden. Bei den meisten Untersuchungen, welche das Verhalten von Peptiden gegen Carbonylverbindungen bisher prüften, wurde nämlich Formaldehyd (meist als Formalin) eingesetzt.

Zusammenfassend stellen wir fest:

a) Peptide, welche die notwendigen Strukturmerkmale aufweisen, nämlich eine freie terminale Amino- oder Iminogruppe und im Abstand von drei Bindungen dazu ein Amid-N mit mindestens einem Proton, können mit Carbonylverbindungen unter milden Bedingungen zu 4-Imidazolidinonderivaten kondensieren.

(Unter den Kondensationsbedingungen, wie sie von uns angewendet werden, reagieren N-acylierte Peptide nicht mit Carbonylverbindungen. Fehlt andererseits das notwendige Proton an der N-terminalen Amidbindung, beispielsweise bei präterminalem Prolin, so können ebensowenig 4-Imidazolidinone isoliert werden. H r u b y [42], der das Verhalten von Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 in Aceton untersucht hatte, isolierte das Peptid unverändert. Aus der stark geänderten spezifischen Drehung des Peptids in acetonischer Lösung schloss er, dass wahrscheinlich einfache Amin-Carbonyl-Addukte vorlagen, z.B. das α-Carbinolamin sowie teilweise die Schiff'sche Base.

b) Die Kondensationsfreudigkeit ist von den Substituenten an der Carbonylgruppe abhängig. Von den einfachsten Carbonylverbindungen erweist sich Acetaldehyd als am reaktivsten, führt jedoch im allgemeinen zur Entstehung diastereoisomerer Gemische.

c) Zwischen individuellen Peptiden können beträchtliche Unterschiede bezüglich ihrer Reaktivität gegen eine Carbonylverbindung auftreten. Ueber den Einfluss der Aminosäurenzusammensetzung und der Peptidgrösse auf das Ergebnis der Kondensation sind jedoch keine Voraussagen möglich! (Man be-

rücksichtige hingegen, dass gewisse in Peptiden vorkommende funktionelle Gruppen mit Carbonylverbindungen zu anderen Produkten, als zu 4-Imidazolidinonen umgesetzt werden können, vgl. Abschnitt 3.2.2).

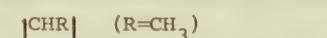
4. 4-IMIDAZOLIDINONE - EIN POTENTIELLES INSTRUMENT IN DER PEPTIDCHEMIE

Die terminale N,N'-Alkylidengruppierung repräsentiert die ungewöhnliche Kombination einer Aminoschutzgruppe mit einer Amidschutzgruppe. Das Interesse des Peptidchemikers an neuen Schutzgruppen, insbesondere solchen, die sich in ihren Abspaltungsbedingungen stark von bekannten Schutzgruppen unterscheiden, ist nach wie vor gross. Was den Schutz des Amid-Stickstoffs betrifft, sind unseres Wissens bisher keine Schutzgruppen für die Peptidbindung entwickelt worden. Diese Aspekte der Imidazolidinone rechtfertigen eine zusammenfassende Darstellung ihrer chemischen Eigenschaften unter den Gesichtspunkten der Peptidsynthese.

4.1 N,N'-Alkyliden als Aminoschutzgruppe

4.1.1 Basizität der 4-Imidazolidinone

Der Vergleich der Titrationskurven von ungeschützten Peptiden mit denjenigen ihrer Imidazolidinone zeigt auffällige Unterschiede. Das für die freie Aminogruppe charakteristische Puffergebiet um pH 8-10 fehlt bei den Imidazolidinonen; respektive ist nach tieferem pH verschoben. Die Titrationskurve des Imidazolidinons



(R=CH_3) (7)

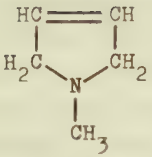
in wässrigem Dioxan (40-proz.) lässt ein Puffergebiet, einem Proton entsprechend, mit pK_a = 3.5 erkennen. (In Peptiden mit anderen ionisierbaren Gruppen wie Carboxyl- oder Imidazol- (Histidin) fallen mehrere Puffergebiete zusammen und eine Auswertung ist aufwendig.)

Angaben zur Basizität von Imidazolidinonen finden wir nur bei O s a m u [76], welcher für verschiedene, einfache 4-Imidazolidinone Werte von pK_a = 2.7 - 4.8 fand. All diese Daten zeigen, dass die Basizität des Aminostickstoffs (N-1) in 4-Imidazolidinonen auffällig gering ist (vgl. p-Chloranilin pK_a = 3.8). Wie ist die starke Verminderung der Basizität, um ca. 4.5 pK-Einheiten, in den N,N'-Alkylidenderivaten zu erklären? Bei der Deutung der Basizität von Aminen werden folgende Effekte diskutiert: a) Sterische Hinderung der Protonierung des Amins, sowie Hinderung der Solvatisierung der Ammoniumform durch die Substituenten am Stickstoff. b) Ringspannung am Stickstoff. c) Induktive Effekte der Substituenten am Stickstoff. Wir wollen versuchen, ihren relativen Einfluss im Falle der 4-Imidazolidinonstruktur abzuschätzen:

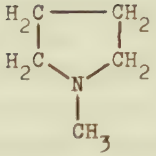
a) Die Substitution eines Amin-Wasserstoffs, z.B. durch Aethyliden, lässt nur geringe Basizitätsänderungen aufgrund sterischer Hinderung erwarten; man vergleiche verschiedene N-Alkyl-Aminosäuren [124]:

Glycin	pK_a = 9.6	Prolin pK_a = 10.6
N-Methyl-Glycin	10.0	
N-Dimethyl-Glycin	9.9	

b) Die protonierte Ammoniumform verlangt eine tetraedrische Anordnung der Substituenten am Stickstoff mit Bindungswinkeln um 109°. Es ist denkbar, dass in 4-Imidazolidinonen der 5-Ring, welcher durch die Lactamgruppe zu einer planaren Konfiguration versteift ist, der Ausbildung der tetraedrischen Konfiguration des Stickstoffatoms entgegenwirkt. (In einem regulären Fünfeck würde der Bindungswinkel 108° betragen.) Als Vergleich für den Einfluss des versteiften 5-Ringes dienen uns die Angaben zum 1-Methyl-pyrrolin-(Δ-3) und seinem gesättigten Derivat [125]:



pK_a = 9.9

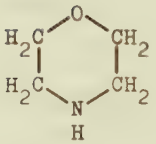


pK_a = 10.5

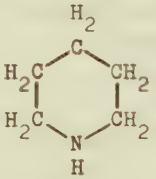
pK_a = 10.7

Es ist ersichtlich, dass die Basizität des Stickstoffs durch die spezielle Ringstruktur nur wenig verändert wird.

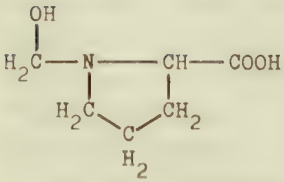
c) Polare Effekte der Substituenten auf die Elektronendichte am Stickstoff können leicht zu grossen Basizitätsänderungen führen, man vergleiche:



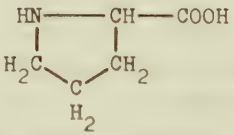
pK_a = 8.4



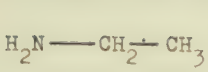
pK_a = 11.2 (ΔpK_a = 2.9) [117]



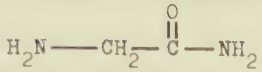
pK_a = 8.3



pK_a = 10.6 (ΔpK_a = 2.4) [124]

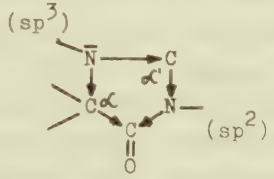


pK_a = 10.6



pK_a = 7.9 (ΔpK_a = 2.7)

Im Imidazolidinon-Molekül sind Basizitäts-vermindernde Effekte der Lactamgruppe am Aminostickstoff wirksam:



Die Methode von C l a r k [126] erlaubt uns eine quantitative Abschätzung. Sie basiert auf der Korrelierung der Basenstärken von Aminen mittels einer Taft-Beziehung nach H a l l [127]. Für ein 4-Imidazolidinon ergibt sich damit:

Grundwert für tertiäres Amin	pK_a = 10.0
→$CONH_2$ am α-C von aliphat. Amin	- 2.8
→NH-CO-CH_3 am α-C von aliphat. Amin	- 3.0
	pK_a = 4.2

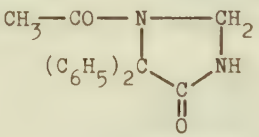
Die einfache Abschätzung, unter Berücksichtigung nur der polaren Effekte in der Struktur, ergibt so eine annehmbare Voraussage der gemessenen pK_a-Werte der 4-Imidazolidinone.

Die verminderte Basizität des Aminostickstoffs der 4-Imidazolidinone im Vergleich zu den Peptiden mit freier Aminogruppe ist die Ursache für deren schwache Reaktivität gegen acylieren-

de (elektrophile) Reagenzien, d.h. für die Schutzgruppenwirkung von N,N'-Alkyliden, wie diese in den folgenden Abschnitten belegt wird.

4.1.2 Acylierungsversuche an 4-Imidazolidinonen

Verschiedentlich finden sich in der Literatur Acylierungen von einfachen 4-Imidazolidinonen verzeichnet. D a v i s [87] erhielt unter der Einwirkung von Essigsäureanhydrid (Ac_2O) durchwegs nur die 1-Acetylderivate, während M a r x e r [85] mit Ac_2O in Pyridin bei ZT ein 1-Acetyl-, beim Erhitzen jedoch ein 1,3-Diacetylderivat erzielte. Erhitzen der 1,3-di H-imidazolidin-4-one mit Ac_2O oder Benzoylchlorid ergab bei E d w a r d [54] in allen Fällen die Diacylderivate. Bildung und Stabilität der 1-Acyl-imidazolidin-4-one können stark von den Substituenten in 2- und 5-Stellung beeinflusst werden. Die extreme Hydrolysebeständigkeit des 1-Acetyl-5,5-diphenyl-imidazolidin-4-on:



liess B i l t z [136] falsche Strukturvorschläge formulieren, welche erst in neuerer Zeit durch E d w a r d [54] revidiert worden sind.

Bei unseren Versuchen, das Imidazolidinon

$\left|\begin{matrix}CHR\\ \\ Val\text{-}His\text{-}Pro\text{-}Phe\text{-}OMe\end{matrix}\right|$ $(R=CH_3)$ (5a,b) mit Ac_2O in Methanol oder Pyridin zu acetylieren, erhalten wir stets Gemische, verursacht durch den, ebenfalls acylierbaren Histidin-Rest im Peptid. Dasselbe

ereignet sich bei den Versuchen zur Einführung der Benzyloxycarbonylgruppe mittels CbO-Chlorid in Aethanol-Wasser. Diese Versuche hatten die Herstellung von, für die Massenspektrometrie besonders geeigneten, acylierten und permethylierten Derivaten zum Ziel. Da aber selbst acylierte Imidazolgruppen (Histidin) beim Permethylieren quaternisiert werden, haben wir diese Acylierungsversuche nicht weitergeführt.

4.1.3 Peptidkupplungsversuche an 4-Imidazolidinonen

Im Bestreben auch nichtterminale N,N'-Alkylidenderivate von Peptiden in die Hand zu bekommen, haben wir versucht, diese durch Kupplung am Aminostickstoff des entsprechenden terminalen N,N'-Alkyliden-peptidesters mit Carboxyl-aktivierten Aminosäurederivaten herzustellen. Abwohl eine Acylierung von 4-Imidazolidinonen unter Verwendung drastischer Methoden (nach Abschnitt 4.1.2) möglich ist, war es ungewiss, ob sie auch nach den milden Acylierungsverfahren der Peptidsynthese erzielt werden konnte. Wie bereits erwähnt (p 5) reagieren Imidazolidinone nicht mit aktivierten Aminosäureestern (p-Nitrophenyl-) [1].

Für unsere Kupplungsversuche haben wir als Aminkomponente das Imidazolidinon $\left|\begin{matrix}CHR\\ Val\end{matrix}\right|$-His-Pro-Phe-OMe (R=$CH_3$) (5a,b) gewählt, welches mit Z-Val-Tyr-OH zum nichtterminalen Imidazolidinon

Z-Val-Tyr-$\left|\begin{matrix}CHR\\ Val\end{matrix}\right|$-His-Pro-Phe-OMe (R=$CH_3$) (10) verknüpft werden sollte.

---

1) Es ist bekannt geworden [132], dass bereits die N-Methylgruppe in N-Me-Leu-OMe die Acylierung durch Z-Val-ONp verhindert.

An Kupplungsmethoden haben wir geprüft:
- Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) nach S h e e h a n [130]
- Carbonyldiimidazol (CDI) nach A n d e r s o n [129]
- Gemischte Anhydride mit Chlorameisensäureisobutylester (CAEI) in der Ausführungsform von T i l a k [128]

Das Ergebnis aller Versuche ist negativ, d.h. im Reaktionsgemisch konnte das Imidazolidinon (10) des Cbo-Hexapeptidesters (1) nie nachgewiesen werden.

Eine indirekte Bestäigung dieser Resultate lässt sich den Arbeiten über Aceton-Oxytocin der d u V i g n e a u d - Gruppe entnehmen. Diese Autoren haben nicht versucht, Peptidkupplungen am 4-Imidazolidinon-Stickstoff auszuführen. Vielmehr benützten sie die N,N'-Isopropylidengruppe de facto als Aminoschutzgruppe bei der Kupplung von $\left|\begin{matrix}CRR \\ Cys(Bzl)\end{matrix}\right|_{Tyr\text{-}OH}^{(R=CH_3)}$ mit H-Ile-Gln-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 mittels CAIE, Y a m a s h i r o [131]. Eine gezielte Anwendung als Aminoschutzgruppe fand der Isopropylidenrest bei der Synthese von Oxytocinoyl-oxytocin; Aceton-Oxytocinoylsäure wurde mittels Woodwards-Reagens K (N-Aethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonat) mit Oxytocin gekuppelt, wonach die Isopropylidengruppe durch sehr verdünnte Essigsäure bei 90°C in 30 Min. abgespalten werden konnte T a k a s h i m a [133].

Zusammenfassend stellen wir fest:
- Die terminale N,N'-Alkylidengruppe erweist sich in Peptidderivaten als Aminoschutzgruppe, indem sie die Acylierung des Aminostickstoffs durch einige, in der Peptidsynthese oft gebrauchte, Kupplungsreagenzien verhindert. Sie erfüllt in der Regel auch die Forderung nach leichter Abspaltbarkeit (vgl. Abschnitt 3.3.1).
- Als Ursache für den Schutzgruppeneffekt des Alkylidensubstituenten machen wir die verminderte Basizität des Aminostick-

stoffs in den 4-Imidazolidinonen verantwortlich.
- Durch starke Acylierungsmittel (Anhydride, Säurechloride, evtl. bei erhöhter Temperatur) können 4-Imidazolidinone in ihre 1-Acylderivate überführt werden.

4.2 N,N'-Alkylidenschutzgruppe unter einigen Reaktionsbedingungen der Peptidsynthese

4.2.1 Verhalten beim Abspalten von Schutzgruppen

a) Hydrogenolysen:
Schutzgruppen vom Benzylester- oder O-Benzylurethantyp werden üblicherweise mit Wasserstoff über Pd-Kohle in Essigsäure oder in Salzsäure-haltigem Alkohol abgespalten. Wir haben wiederholt festgestellt, dass Imidazolidinone unter diesen Reaktionsbedingungen, selbst bei erhöhter Temperatur (60°C), über Stunden beständig sind.

b) Acidolysen:
Die beiden wichtigen Schutzgruppen t-Butyloxycarbonyl (Boc-) und t-Butylester (-OBu^t) werden zumeist durch Säuren abgespalten. Zur Anwendung gelangen: Salzsäure in Alkohol, Trifluoressigsäure, Bromwasserstoff in Essigsäure und ähnliches. Durch Behandlung mit konzentrierter Salzsäure bei 45°C werden aber auch Schutzgruppen wie Ester oder Benzyloxycarbonyl und andere abgespalten. Dies ist eine bequeme Methode, um geschützte Peptide, z.B. zu chromatographischen Zwecken, rasch von ihren Schutzgruppen zu befreien S c h w y z e r [134]. Da Imidazolidinone gegen starke Säuren beständig sind, übersteht die N,N'-Alkylidengruppe diese Abspaltungsbedingungen unbeschadet. So konnte Z e h a v i [41] in einem Falle, wo eine Hydrogenolyse der Cbo-Gruppe nicht anwendbar war, diese mittels Brom-

wasserstoff (25-proz. in Essigsäure) selektiv vor der N,N'-Alkylidengruppe abspalten.

c) Natrium in flüssigem Ammoniak:
Die Methode findet hauptsächlich Anwendung zur Entfernung von S-Benzylgruppen. Am Beispiel des Aceton-Oxytocins wurde gezeigt, dass die N,N'-Isopropylidengruppe diese Behandlung übersteht Y a m a s h i r o [131].

Die N,N'-Alkylidengruppe selbst kann aus terminalen Imidazolidinonen leicht durch Hydrolyse bei neutralem oder schwach saurem pH abgespalten werden (vgl. Abschnitt 2.3.1). Da die meisten bekannten Schutzgruppen (mit Ausnahme der Tritylgruppe) unter diesen Bedingungen stabil sind, ist für die N,N'-Alkyliden-Schutzgruppe die Forderung nach reziprok selektiver Abspaltungsmöglichkeit erfüllt.

4.2.2 Verhalten bei Kupplungsreaktionen

Die bisher auf Imidazolidinone angewendeten Kupplungsmethoden wurden bereits in Abschnitt 4.1 besprochen. Danach schützt die N,N'-Alkylidengruppe den Aminostickstoff gegen schonende Acylierung. Säureanhydride, Säurechloride hingegen, können am Imidazolidinonring acylierend wirken.

4.2.3 Verhalten gegen Oxidationsmittel

Oxidationsschritte in Peptidsynthesen sind zur Herstellung von Cystin-Peptiden notwendig. Bei einer Synthese des N,N'-Isopropyliden-oxytocins konnte Y a m a s h i r o [131] zeigen, dass die Imidazolidinongruppierung die Oxidation der SH-Gruppen zu S-S-Brücken mittels verdünnter Kaliumferricyanid-Lösung, bei neutralem pH, unbeschadet übersteht.

Im weiteren können noch einige Angaben zum Einfluss starker Oxidationsmittel gemacht werden:

- 4-Imidazolidinone konnten präparativ aus Imidazolidin-4-thionen durch Einwirkung von 30-proz. Wasserstoffperoxid in alkalisch-methanolischer Lösung hergestellt werden; erstere sind gegen dieses Oxidationsmittel also einigermassen beständig [1].
- Durch CrO_3 in Essigsäure oder durch $KMnO_4$ in alkalischer Lösung werden die 4-Imidazolidinone, teilweise unter Ringöffnung angegriffen. Diese Reaktionen wurden bisher nur an den - etwas speziellen - 2,2-Diphenyl-imidazolidin-4-on-derivaten untersucht E d w a r d [54].

4.3 N,N'-Alkyliden eine Amidschutzgruppe?

4.3.1 Zum Begriff einer Amidschutzgruppe

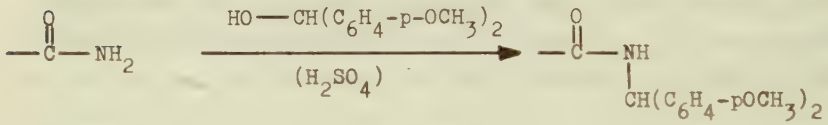
Die Anforderungen an eine Aminoschutzgruppe sind wohl bekannt; sie sollte das freie Elektronenpaar des Stickstoffs derart beanspruchen, dass dieser nicht mehr nucleophil ist. Ausserdem sollte sie racemisierungsfreie Kupplungen gewährleisten. Sie soll schliesslich leicht einführbar und selektiv abspaltbar sein. Aufgaben und Eigenschaften einer Amidschutzgruppe müssen hingegen erst definiert werden!

Wir unterscheiden zwischen den primären Amidgruppen, wie sie Carboxylterminal, oder in den Seitenketten von Asparagin und Glutamin, in Peptiden häufig vorkommen, und den Amidgruppen

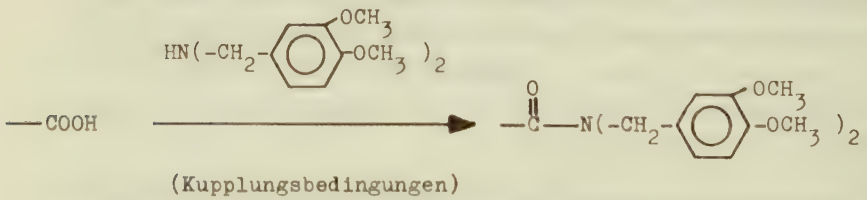
---

[1] Wasserstoffperoxid wurde schon zur schonenden Entfernung der N-Formylschutzgruppe vorgeschlagen L o s s e [135].

im backbone. Für erstere wurde schon verschiedentlich nach Schutzgruppen gesucht, welche die Tendenz der β- und γ-Amidfunktionen zu unerwünschten Nachbargruppenbeteiligungen und zur Nitrilbildung herabsetzen. Erst kürzlich scheinen Lösungen gefunden worden zu sein: K o e n i g [143] erhielt durch Einwirkung von 4,4'-Dimethoxy-benzhydrol und Schwefelsäure in Eisessig die entsprechenden N-(4,4'-Dimethoxy-benzhydril)-amide (Mbh-):



Die Mbh-Gruppe ist stabil gegen katalytische Hydrierung, kann aber durch TFA in Anisol rasch entfernt werden. Die Schutzgruppe hat den Nachteil, bei den Bedingungen der alkalischen Verseifung Anlass zu Nebenprodukten zu geben. In diesen Fällen kann mit Vorteil die von W e y g a n d [142] entwickelte 2,4-Dimethoxybenzylgruppe (Dmb-) verwendet werden:



Auch diese Schutzgruppe kann gut mit wasserfreier TFA abgespalten werden, soll aber gegen alkalische Hydrolyse oder katalytische Hydrogenolyse stabil sein. Soviel zum Schutz der primären Amidgruppen; wie und zu welchem Zweck könnte man sich den Schutz einer Peptidbindung vorstellen?

Die Peptidbindung besitzt potentiell drei reaktive Stellen: den nucleophilen Amid-Sauerstoff (Oxazolonbildung), den nucleophilen Amid-Stickstoff (Diacylimidbildung) sowie den elektrophilen Amid-Kohlenstoff (Hydrolyse, Aminolyse und Umlagerung über intermediäre Cyclole). Es wird kaum möglich sein, alle diese Reaktionen durch Schutzgruppen zu verunmöglichen, ohne die Peptidbindung irreversibel zu verändern. Hingegen ist eine Blockierung wenigstens all jener Reaktionen denkbar, an denen der Wasserstoff-substituierte Amid-Stickstoff beteiligt ist. In diesem Sinne wollen wir vorläufig als 'Schutzgruppe' für die Peptidbindung jeden Substituenten bezeichnen, welcher das Amidproton ersetzend, die Reaktivität der Peptidbindung vermindert.

Die wichtige Rolle des Amidprotons sei an einigen Beispielen erläutert:

- Die Bildung von Diacylimiden, sei es durch intramolekulare Acylierung (z.B. -COOH in Seitenketten), oder durch 'backbone-acylation' bei Aminoacylierungen setzt ein Amidproton voraus.
- Kondensationen mit Carbonylverbindungen, wie wir sie am Beispiel der Imidazolidinonentstehung kennengelernt haben, sind ausgeschlossen, wenn das Proton der terminalen Amidbindung fehlt.
- Racemisierung nach dem Oxazolon-Mechanismus ist bei Prolinderivaten verunmöglicht [1].
- Gewisse Umlagerungsreaktionen von Peptiden im Massenspektrometer bleiben aus, wenn durch Permethylierung die Amidpro-

---

[1] Die Ursache hierfür ist allerdings weniger im Fehlen des Amidprotons zu sehen, wie dies ursprünglich von d u V i g n e a u d postuliert wurde, sondern vielmehr in der speziellen sterischen Situation im Prolinring, da beispielsweise N-Methyl-Aminosäurederivate besonders Racemisierungsgefährdet sind [146].

tonen substituiert wurden.
- Manche Peptidasen können nur Peptidbindungen angreifen, welche ein Amidproton aufweisen.

N-Alkyl-Substituenten können nicht mehr aus dem Peptid entfernt werden und sind deshalb nur bedingt als Schutzgruppen zu bezeichnen. N-Acyl-Substituenten verwandeln die Amidgruppe - statt ihre Reaktivität herabzusetzen - in die reaktionsfreudigen Imide vom Diacyl- bzw. Urethan-acyl-Typus; erhöhte Hydrolyse- bzw. Aminolyseempfindlichkeit der ursprünglichen Peptidbindung. So ist erkennbar, dass Alkyl- oder Acylgruppen die Anforderungen an eine Schutzgruppe nur unvollständig oder gar nicht erfüllen. Die N,N'-Alkylidengruppe eröffnet hier vielleicht neue Möglichkeiten.

4.3.2 N,N'-Alkyliden als Schutzgruppe für die Peptidbindung

In unseren Imidazolidinonen aus Peptiden ist das Proton der terminalen Amidgruppe durch den Alkyliden-Kohlenstoff substituiert. Der Alkylidenrest kann unter milden Bedingungen eingeführt und selektiv wieder entfernt werden. Die N,N'-Alkylidengruppe kann somit als Schutzgruppe für die N-terminale Peptidbindung bezeichnet werden.

Es wäre nun von grossem Interesse, auch über nichtterminale N,N'-Alkylidenderivate von Peptiden verfügen zu können. Unsere Versuche, diese durch Peptidkupplungen an entsprechenden terminalen Imidazolidinonen herzustellen, blieben, der Schutzwirkung der Alkylidengruppe auf den zu acylierenden Stickstoff wegen, ohne Erfolg (vgl. Abschnitt 4.1.3). Zu ihrer Herstellung müssen andere Wege gefunden werden. In solchen, nichtterminalen N,N'-Alkylidenderivaten von der allgemeinen Struktur

sind die beiden Peptidbindungen einer Tri-

peptidsequenz durch dieselbe Alkylidengruppe 'geschützt'.

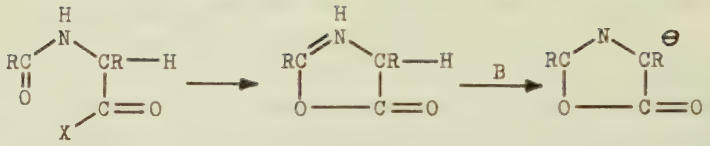
4.4 Ausblick

Die N,N'-Alkylidengruppe sollte zur Lösung verschiedener Aufgaben in der Peptidchemie in Betracht gezogen werden.

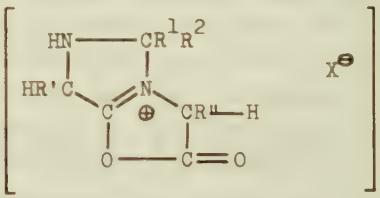
1. Als neuartige Aminoschutzgruppe für Peptide ergänzt sie das bestehende Angebot, wobei ein besonderer Vorteil in der selektiven Abspaltbarkeit durch praktisch neutrale Hydrolyse zu sehen ist.

2. Es wäre von grossem Interesse abzuklären, ob eine N,N'-Alkylidengruppe in Dipeptidderivaten die Carboxyl-terminale Aminosäure vor der Racemisierung bei Kupplungen am Carboxylende zu schützen vermag. Ein Schutz der Aminogruppe verbunden mit Schutz vor Racemisierung würde den rationellen Einsatz von Dipeptidfragmenten bei Peptidsynthesen ermöglichen, was bisher nur in Spezialfällen (Gly oder Pro) oder mit racemisierungsfreien Kupplungsmethoden möglich ist.
   Die Racemisierung carboxylaktivierter Aminosäurederivate kann nach herrschender Auffassung nach zwei Mechanismen erfolgen:
   a) Direkte Einwirkung einer Base auf das Proton am α-C:

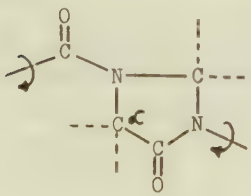
   b) Abstraktion eines Protons von einem intermediären Oxazolon:



Rückprotonierung der anionischen Derivate führt alsdann zur Racemisierung der Aminosäure. Im N,N'-Alkylidenderivat eines Dipeptids kann eine Veränderung der Racemisierungstendenz der gefährdeten carboxylterminalen Aminosäure erwartet werden; beispielweise würde Racemisierung nach dem Oxazolon-Mechanismus die Ausbildung eines geladenen Bicyclus bedingen:

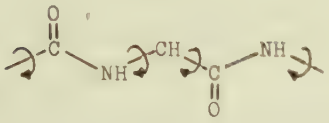


3. Die Einführung einer N,N'-Alkylidengruppe an definierter Stelle des backbones entspricht einer gezielten Einflussnahme auf die Konformation des Peptids. Anders als bei den ähnlich wirkenden Prolinderivaten, ist bei den Imidazolidinonen auch die Drehbarkeit um die Bindung zwischen dem α-C und dem Carboxyl-C der verbrückten Aminosäure aufgehoben. In nichtterminalen N,N'-Alkylidenderivaten werden zwei benachbarte Peptidbindungen in derselben Ebene fixiert:



(Die ausgezogenen Bindungen liegen alle annäherungsweise in einer Ebene.)

Vergleiche die unmodifizierte Dipeptidsequenz (Ausschnitt):



(↻ weisen auf die Drehbarkeit um die betreffende Bindung hin.)

4. Die N,N'-Alkylidengruppe ermöglicht Einflussnahme auf die enzymatische Spaltbarkeit einer Peptidbindung. Damit könnte z.B. der Abbau eines synthetischen Peptidwirkstoffes, welcher oftmals durch Spaltung einer ausgezeichneten Peptidbindung im Molekül eingeleitet wird, verzögert werden.

   Schon früher ist versucht worden, durch Substitution am Amid-N,Peptidbindungen vor dem proteolytischen Angriff durch Enzyme zu schützen. Erstmalig wurde eine solchermassen gezielte Modifikation von Oxytocin hergestellt. Die Inaktivierung des Oxytocins im Organismus erfolgt nämlich unter Spaltung der Bindung zwischen dem N-terminalen Cysteyl- und dem folgenden Tyrosylrest. B o i s s o n n a s [144], sowie R u d i n g e r [145] hatten deshalb (N-Methyl-Tyr^{8})-Oxytocin synthetisiert. Da aber die oxytocische Aktivität dieses Derivats nur noch gering ist, fand das Produkt keine weitere Verwendung.

   Eine N,N'-Alkylidengruppe, welche unter physiologischen Bedingungen langsam abgespalten wird, könnte einen Peptidwirkstoff vor der raschen Inaktivierung durch spezifische Peptidasen schützen, ohne seine - erwünschte - Wirkung zu beeinträchtigen. Eine solche N,N'-Alkylidengruppe könnte als 'physiologische Schutzgruppe' bezeichnet werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

5. Allgemeines

IR-Spektren wurden auf einem Spektrographen BECKMAN IR-8 aufgenommen.
NMR-Spektren (100 Mhz) ermöglichte Dr. H. Fuhrer in der CIBA AG, Basel.
Massenspektren verdanken wir Dr. H. Hürzeler in der CIBA AG, Basel.
Osmotische Molekulargewichte wurden von K. Hofer jun. auf einem Mikrodampfdruckosmometer KNAUER bestimmt.

Die Drehungen wurden auf einem automatischen Polarimeter PERKIN-ELMER 141 gemessen.

6. Methoden

6.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Sie erfolgt auf Kieselgel-G Schichten MERCK mit Fluoreszenzindikator. Zur besseren Reproduzierbarkeit der Trennungen werden die Platten über einer gesättigten Lg von Calciumchlorid klimatisiert (35 Proz. relative Luftfeuchtigkeit).

Fliessmittel (Gemische in Volumteilen):

a Chl-MeOH (8:2)
b Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser (150:20:6:11)
c Diäthylketon-Pyridin-Ameisensäure-Wasser (65:18:11:6)
d Chl-Aceton (7:3)
e Petroläther 40-60°-Aether (7:3)
(Entwicklung der Chromatogramme mit Kammersättigung)

Der R_f-Wert r einer Substanz im Fliessmittel a wird mit a/r angegeben. Alle zitierten R_f-Werte sind nur als Anhaltspunkte aufzufassen. Sie sind nur unter exakt standardisierten Bedingungen reproduzierbar.

Revelation

UV: Fluoreszenzlöschung im UV-Licht von 254 nm.

NE: Besprühen mit Ninhydrinreagens und Erwärmen im Heizschrank (5-10 Min. bei 120°C). Reagens nach S t a h l [137].

IRH: Chlor-Tolidin Reaktion nach S t a h l [137].

PR: Diazotierte Sulfanilsäure (Pauly-Reagens) nach S t a h l [137].

- 4-Imidazolidinone werden durch NE (5 Min. bei 100°C) nicht revelliert, erst längeres Erwärmen (10 Min. bei 120°C macht sie sichtbar.
- Permethylierte Peptidderivate lassen sich nicht mehr wie üblich mit IRH blauschwarz anfärben; einige Minuten nach der Behandlung nach IRH treten sie jedoch als blassgelbe Flecken auf grau-blauem Grund hervor.
- Histidin-haltige Derivate werden mit PR gelb, Tyrosin-haltige orange angefärbt.

6.2 Säulenchromatographie

Lösungsmittel: Die Elution der freien und geschützten Peptidester vom Kieselgel erfolgt mit Chl, welches 1-15 Proz. (v/v) MeOH oder EtOH enthält. Handelsübliches Chl wird mit 1 Vol-Proz. Petroläther (40-60°) versetzt, mehrere Male mit Wasser gewaschen, über Nacht mit Calciumchlorid geschüttelt, filtriert und destilliert. 10 Proz. Vor- und Nachlauf werden abgetrennt. Das so aufbereitete Chl ist alkoholfrei und kann, vor Licht

geschützt, mehrere Monate aufbewahrt werden, ohne dass Phosgen-Geruch festgestellt würde.

Anordnung: Eine Dosierpumpe fördert das Elutionsmittel mit gleichmässiger Geschwindigkeit auf ein Chromatographierohr (2.5 x 30 cm), welches eine Füllung von Kieselgel enthält. Das Eluat durchfliesst eine UV-Messzelle (254 nm) UVICORD LKB und wird in einem Fraktionenkollektor aufgefangen. Ein Kompensationsschreiber zeichnet den zeitlichen Verlauf der UV-Absorption des Eluats auf und markiert die Fraktionenwechsel. Zur Elution mit linearen Konzentrationsgradienten verwenden wir die apparativ einfache Anordnung nach W r e n [141].

Ausführung: Das Chromatographierohr wird mit einer Aufschlämmung von 50 g Kieselgel MERCK in 120 ml Chl beschickt und in der obigen Anordnung mit ca. 300 ml des ersten, zur Anwendung gelangenden Elutionsmittels gewaschen. Sodann werden 100-500 mg Substanz, in möglichst wenig Chl gelöst, aufgetragen und mit ca. 5 ml/min eluiert. Der Gang der Auftrennung wird durch die UV-Absorptionsmessung verfolgt, überdies werden Proben der Fraktionen mittels DC untersucht. Fraktionen gleicher Zusammensetzung werden vereinigt, am Vakuum eingedampft und am Hochvakuum getrocknet.

6.3 Permethylierung von Peptiden zur Untersuchung im Massenspektrometer

Nach T h o m a s [63] werden 0.5-20 mg gut getrocknetes Peptid [1] in einem 1 ml-Schraubdeckelgläschen mit 50 mg Silber-

---

1) Sind freie Aminogruppen vorhanden, müssen diese durch Acylierung gegen Alkylierung zu quaternisierten Ammoniumderivaten geschützt werden; z.B. durch Essigsäureanhydrid-Pyridin (1:1), 1-2 h bei ZT, oder Essigsäureanhydrid-MeOH (1:4), 4 h bei ZT.

oxid (über P_2O_5 und KOH getrocknet) vermischt, 0.3 ml DMF und 0.2 ml Methyljodid zugefügt und das Reaktionsgemisch unter häufigem Schütteln während 4 h bei 50°C gehalten. Das Reaktionsgemisch wird über eine kleine Fritte abgenutscht, mit 0.5 ml DMF nachgewaschen und das Filtrat in 20 ml Chl aufgenommen, wobei ein weisser Niederschlag (Ag-Salz) ausfällt. Die Chl-Suspension wird mit 10 ml KCN-Lg (5-proz.), dann drei Mal mit 10 ml Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und am Vakuum eingedampft.
Der Rückstand kann direkt im Massenspektrometer untersucht werden. Das Rohprodukt enthält meist polare Verunreinigungen, welche mittels präparativer DC leicht abgetrennt werden können (z.B. Fliessmittel d). Quaternäre Ammoniumjodide können auf DC durch Besprühen mit KJO_3 (1-proz.) in 1N HCl als gelbe Flecken nachgewiesen werden.

6.4 Nachweis und quantitative Bestimmung der Carbonylkomponenten

6.4.1 Vergleich der 2,4-Dinitrophenylhydrazone

Reagens: 0.25 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0.6 ml 6N HCl gelöst und mit 25 ml MeOH verdünnt.
Ca. 1 mg des Peptids werden mit 0.1 ml Reagens in der Kapillare während 60 Min. auf 100°C erhitzt. Proben (2 µl) dieser Lösung, des Reagens, sowie von Lösungen authentischer DNPH werden mittels DC verglichen.

Revelation: - UV
- 0.2-proz. $K_3[Fe(CN)_6]$ in 2N HCl
(blaue Flecken)

R_f: Reagens am Start

CH_2O-DNPH	e/0.26
CH_3CHO-DNPH	e/0.33
CH_3COCH_3-DNPH	e/0.42

6.4.2 Quantitative Bestimmungen

In einem kleinen Destillationskolben werden ca. 10^{-6} Mol des Imidazolidinons mit 10 ml Wasser zum Sieden erhitzt und das Destillat in einem bei $0^{o}C$ gekühlten Messkölbchen aufgefangen. Aliquote Teile des Destillats werden zur Bestimmung der Carbonylverbindungen verwendet.

Aceton nach B e r n t s s o n [72]: Zum Destillat, enthaltend ca. $0.5 \cdot 10^{-6}$ Mol Aceton, gibt man 2 ml NaOH-Lg, verdünnt mit Wasser auf ca. 25 ml, fügt aus einer Mikrobürette 0.60 ml Salicylaldehyd, schüttelt, gibt weitere 20 ml Natronlauge hinzu und füllt mit Wasser bis 50 ml auf. Nach 3 h bei ZT misst man in der 1 cm-Küvette bei 474 nm die Extinktion gegen den Blindwert der Reagenzien. Die Menge des Acetons entnommt man einer Eichkurve. (Eine Extinktion von 0.356 entspricht $1 \cdot 10^{-6}$ Mol Aceton.)

Reagenzien: - 425 g NaOH in 1 l Wasser
- Salicylaldehyd (MERCK p.a.)

Acetaldehyd nach P r e u s s m a n n [73]: Zu 1.0 ml des Destillats enthaltend ca. $0.5 \cdot 10^{-7}$ Mol Acetaldehyd gibt man 50 µl $CuSO_4$-Lg und aus einer Bürette 8.0 ml H_2SO_4 konz. unter Schütteln und Eiskühlung, fügt 0.20 ml 4-Hydroxybiphenyl-Reagens zu, lässt 30 Min. bei ZT unter häufigem Schütteln stehen, erhitzt genau 3 Min. im siedenden Wasserbad, kühlt auf ZT ab und füllt mit H_2SO_4 bis 10 ml auf. Man misst die Extinktion

bei 570 nm gegen den Blindwert der Reagenzien. Die Menge des Acetyldehyds entnimmt man einer Eichkurve, welche mit Paraldehyd als Eichsubstanz erstellt wurde. (Eine Extinktion von 0.540 entspricht $1 \cdot 10^{-7}$ Mol Acetaldehyd.)

Reagenzien:
- H_2SO_4 konz.
- 780 mg $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ in 10 ml Wasser
- 1.0 g 4-Hydroxybiphenyl in 25 ml 2N NaOH gelöst und mit Wasser auf 100 ml verdünnt

Formaldehyd nach P r e u s s m a n n [73]: Zu 10 ml des Destillats enthaltend ca. $0.5 \cdot 10^{-6}$ Mol Formaldehyd gibt man 2.0 ml Chromotropsäure-Reagens und füllt mit H_2SO_4 konz. bis 25 ml auf, erhitzt im siedenden Wasserbad 30 Min., kühlt auf ZT ab und ergänzt mit Wasser auf 25 ml. Man misst die Extinktion bei 560 nm gegen den Blindwert der Reagenzien. Die Menge des Formaldehyds entnimmt man einer Eichkurve, welche mit Hexamethylentetramin als Eichsubstanz erstellt wurde. (Eine Extinktion von 0.656 entspricht $1 \cdot 10^{-6}$ Mol Formaldehyd.)

Reagenzien:
- 2.0 g Chromotropsäure, Na-Salz (RIEDEL p.a.) in 40 ml Wasser kurz vor Gebrauch lösen.
- H_2SO_4 konz.

7. Synthese der terminalen N,N'-Alkylidenderivate

Methode A: 1 g Peptid wird im Gemisch von 0.1 g Pd-Kohle (10-proz.), 2 ml NEt_3 und 20 ml MeOH oder EtOH (95-proz.), im Luftstrom am Rückfluss erhitzt. Nach einigen Stunden ist die Reaktion beendet (Kontrolle mittels DC), man filtriert vom Katalysator ab und dampft am Vak (40°C) zur Trockne ein,

Methode B: 1 g des Peptids wird in 20 ml EtOH (90-proz.) gelöst und mit einem einfachen Ueberschuss von Acetaldehyd (dest., Sdp = 20°C) oder Formalin (38-proz.) versetzt. Nach einigen Stunden bei 40°C filtriert man und dampft am Vak zur Trockne ein.

Methode C: 1 g des Peptids wird in 20 ml Aceton gelöst und einige Stunden bei 50°C gehalten. Man filtriert und dampft am Vak zur Trockne ein.

Die nach A, B oder C erhaltenen Rohprodukte werden mittels Säulenchromatographie (nach Abschnitt 6.2) gereinigt.

7.1 $\begin{vmatrix}CHR\end{vmatrix}_{Val}$ (R=CH_3) Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (3a,b)

- Z-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (1), $C_{48}H_{60}O_{10}N_8$, MG 876.9
Hergestellt in der CIBA AG, Basel, nach S c h w y z e r [1].

Smp ca. 155°C
$[\alpha]_D$: -56° (c = 1, MeOH)
DC : a/0.80

- H-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (2), $C_{40}H_{54}O_8N_8$, MG 774.9
1 g Z-Hexapeptidester (1) werden mit 0.1 g Pd-Kohle (10-proz.) in 20 ml MeOH und 0.5 ml 12N HCl bei ZT hydriert. Man filtriert vom Katalysator ab, dampft am Vak zur Trockne ein, nimmt in 10 ml Wasser auf, stellt mit fester Soda auf pH = 7.5 und extrahiert bei 0°C mit Butanol-Chl (1:1). Man erhält 840 mg (95 Proz. d. Th.) der freien Base als festen Schaum. Säulenchromatographie von 500 mg des Rohprodukts auf Kieselgel mit Chl-MeOH (10 Proz.) ergibt 380 mg chromatographisch einheitlichen Hexapeptidester (2).

Smp : 137-139°C
$[\alpha]_D$: -51° (c = 0.5, MeOH)

DC : a/0.42, b/0.04, c/0.13
MG : 100'000 (osmotisch, 40 mg in 1 ml THF)
IR : (in Chl) 3400, 3260, 2960, 1740, 1650, 1520, 1440 cm^{-1}

Esterverseifung: 50 mg des Hexapeptidesters (2) werden in 0.2 ml MeOH gelöst, mit 2.5 ml 0.1N NEt_3 in Wasser versetzt und 40 Min. bei 60°C gehalten. Nach DC ist der Peptidester vollständig verseift. Man dampft am Vak zur Trockne ein, löst in 3 ml EtOH warm und lässt über Nacht im Kühlschrank stehen. Ausbeute:33 mg Hexapeptid, Smp = 176-178°C.

- $\left|\begin{matrix}CHR\\Val\end{matrix}\right|$ (R=CH_3)
Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (3a,b), $C_{42}H_{56}O_8N_8$, MG 801.0

a) 1.0 g Hexapeptidester (2) werden nach Methode A in MeOH umgesetzt. Nach 6 h filtriert man vom Katalysator ab und dampft am Vak zur Trockne ein. (DC des gelb verfärbten Rohproduktes lässt verschiedene unpolare Nebenprodukte erkennen. Das Hauptprodukt kann mittels DC in die beiden Komponenten (3a) c/0.31 und (3b) c/0.38 im Verhältnis ca. 1:1 zerlegt werden.) Säulenchromatographie von 500 mg des Rohprodukts auf Kieselgel mit Chl-MeOH (8 Proz.) ergibt insgesamt 420 mg Imidazolidinon (3a,b). Die Kontrolle mittels DC zeigt, dass eine teilweise Auftrennung der Isomeren (3a) und (3b) erfolgte; es können abgetrennt werden: 180 mg (3b), 20 mg (3a), 220 mg (3a,b).

(3a)	(3b)
Smp : 125-130°C	Smp : 125-130°C
$[\alpha]_D$: -85° (c = 0.5, MeOH)	$[\alpha]_D$: -82° (c = 0.5, MeOH)
DC : a/0.60, b/0.33, c/0.31	DC : a/0.60, b/0.33, c/0.38
CH_3CHO nach Hydrolyse:	CH_3CHO nach Hydrolyse:
96 Proz. d. Th.	98 Proz. d. Th.

IR : (in Chl für (3a) und (3b) identisch) 3400*, 2960, 1740, 1670, 1520*, 1440, 1360 cm^{-1}
(* Absorption geringer im Vgl. zu (2).)

b) 1.0 g Hexapeptidester (2) werden nach Methode B mit 112 mg Acetaldehyd umgesetzt. Nach 12 h ist die Kondensation beendet, nach dem Eindampfen am Vak bleibt das gelbverfärbte Rohprodukt fest zurück. Säulenchromatographie auf Kieselgel mit Chl-MeOH (10 Proz.) ergibt 770 mg farbloses Produkt, welches noch kleine Anteile an unpolaren Verunreinigungen enthält. 350 mg davon werden nochmals der Säulenchromatographie mit 800 ml eines linearen Lgm-Gradienten von 5-15 Proz. MeOH in Chl unterworfen. Es können 214 mg des Imidazolidinons (3a,b) abgetrennt werden, welche nach DC keine Verunreinigungen mehr erkennen lassen.

Smp : 130-132°C
$[\alpha]_D$: -87° (c = 0.5, MeOH)
DC : Gemisch von (3a) c/0.31 und (3b) c/0.38 im Verhältnis ca. 1:1
MG : 1150 ± 60 (osmotisch, 38 mg (3a,b) in 1 ml THF)
IR : wie unter a)
CH_3CHO nach Hydrolyse: 98 Proz. d. Th.
Totalhydrolyse: Val 2.06, Tyr 0.85, His 0.98, Pro 0.97, Phe 1.00

Esterverseifung: 26 mg des Imidazolidinons (3a,b) werden mit 2 ml 6N HCl 20 Min. auf 60°C erhitzt. Man dampft am Vak über KOH zur Trockne ein und erhält 27 mg des verseiften Peptids als Hydrochlorid. DC mit Fliessmittel c' (= c ohne Sättigung der Kammer) erlaubt die vollständige Auftrennung auch der verseiften Derivate.

DC: (2)	c'/0.32		c'/0.18
(3a)	c'/0.52	Methylester → verseift	c'/0.42
(3b)	c'/0.65		c'/0.48

Das nach obiger Vorschrift verseifte Imidazolidinon enthält nur Spuren des freien Hexapeptids.

Hydrolyse der N,N'-Alkylidengruppe: Je 0.3 mg des Imidazolidinons (3a,b) werden mit 60 µl Pufferlösung [1] während 30 Min. auf 80°C erhitzt. Alle Proben werden auf derselben Platte chromatographiert und der Hydrolysegrad visuell abgeschätzt: Maximale Hydrolyse findet sich bei pH = 6.5, unterhalb pH = 3 hat sich nur wenig des freien Peptidesters (2) gebildet.

7.2 $\left|\begin{matrix}CRR\\ \\ \end{matrix}\right|$ (R=CH_3)
Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (9), $C_{43}H_{58}O_8N_8$, MG 815.1

500 mg des Hexapeptidesters (2) werden nach Methode C mit Aceton umgesetzt. Nach 6 h dampft man am Vak ein. Säulenchromatographie auf Kieselgel mit Chl-MeOH (8 Proz.) ergibt 320 mg Imidazolidinon (9), welches nach DC keine Verunreinigungen enthält.

Smp : 120-130°C
$[\alpha]_D$: -68° (c = 0.5, MeOH)
DC : a/0.51, b/0.35, c/0.40
IR : (in Chl) 3400*, 3260*, 2960, 1740, 1670, 1520*, 1440, 1360 cm^{-1} (* Absorption geringer im Vgl. zu (2).)
CH_3COCH_3 nach Hydrolyse: 97 Proz. d. Th.

Oxalat:
Smp : 164-165°C (aus EtOH)

---

1) Universalpuffer nach Britton und Robinson, Biochem. Taschenbuch Bd. 2, 102 (Hsg. H.M.Rauen, Springer-Verlag 1956). Na-Citrat Puffer ebenda p 94.

7.3 $\left|\begin{matrix}CHR\\Val\end{matrix}\right|$-His-Pro-Phe-OMe (5a,b) (R=CH_3)

- Val-His-Pro-Phe-OMe (4), $C_{26}H_{37}O_5N_6$, MG 513.6

Hergestellt in der CIBA AG, Basel, nach S c h w y z e r [1].

Smp : 98-99°C
$[\alpha]_D$: -40° (c = 0.5, MeOH)
DC : a/0.29, b/0.08, c/0.18
IR : (in Chl) 3400, 3240, 2940, 1740, 1640, 1500, 1440 cm^{-1}

- $\left|\begin{matrix}CHR\\Val\end{matrix}\right|$-His-Pro-Phe-OMe (5a,b) (R=CH_3), $C_{28}H_{39}O_5N_6$, MG 539.6

a) 500 mg Tetrapeptidester (4) werden nach Methode A in MeOH umgesetzt, nach 6 h vom Katalysator abfiltriert und am Vak zur Trockne eingedampft. Das stark verfärbte Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit 800 ml eines linearen Lgm-Gradienten von 5-15 Proz. MeOH in Chl gereinigt. Es können 290 mg des Imidazolidinons (5a,b) abgetrennt werden, welche nach DC keine Verunreinigungen erkennen lassen.

Smp : 98-102°C
$[\alpha]_D$: -96° (c = 0.6, MeOH)
DC : (5a) a/0.49, b/0.29, c/0.35
(5b) a/0.56, b/0.34, c/0.42
IR : (in Chl) 3400*, 3240*, 2960, 1740, 1680, 1510*, 1440 cm^{-1} (* Absorption geringer im Vgl. zu (4).)
CH_3CHO nach Hydrolyse: 95 Proz. d. Th.
Totalhydrolyse: Val 0.98, His 0.97, Pro 1.05, Phe 1.00

b) 1.0 g Tetrapeptidester (4) werden mit 80 mg CH_3CHO in 20 ml Wasser 24 h bei ZT stehen gelassen, man filtriert und dampft am Vak unter Zugabe von Benzol/EtOH abs. mehrmals ein. Säulenchromatographie des fast farblosen Rohprodukts auf Kie-

selgel wie unter a) ergibt 610 mg des Imidazolidinons (5a,b) in chromatographisch reiner Form.

Smp : 100-102°C
$[\alpha]_D$: -102° (c = 0.6, MeOH)
DC : wie unter a)
IR : wie unter a)
CH_3CHO nach Hydrolyse: 99 Proz. d. Th.

(EtOH oder MeOH anstelle von Wasser als Lgm verwendet, führt zu stark gefärbten Rohprodukten, welche grössere Anteile an diversen Nebenprodukten enthalten.)

7.4 $\lfloor CHR \rfloor$ (R=CH_3) $\lfloor Pro \rfloor$Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (7)

- Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (6), $C_{33}H_{52}O_7N_4$, MG 616.8

Hergestellt in der CIBA AG, Basel, nach S c h w y z e r [2].

Smp : 152-153°C (aus Essigester/Petroläther)
180°C (aus Chl)
$[\alpha]_D$: -48° (c = 0.4, MeOH)
DC : a/0.43, b/0.36, c/0.10
IR : (in Chl) vgl. Abbildung p 25
Totalhydrolyse: Pro 0.95, Leu 0.98, Glu 0.96, Phe 1.00

- $\lfloor CHR \rfloor$ (R=CH_3) $\lfloor Pro \rfloor$Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (7), $C_{35}H_{54}O_7N_4$, MG 642.8

a) 500 mg Tetrapeptidester (6) werden nach Methode A in EtOH umgesetzt. Nach 2 h filtriert man vom Katalysator ab und dampft am Vak ein. Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chl-MeOH (1 Proz.) ergibt 380 mg des Imidazolidinons (7) als farblosen Sirup, welcher nicht zur Kristallisation gebracht wird.

$[\alpha]_D$: -42^o (c = 0.6, MeOH)
DC : a/0.62, b/0.78, d/0.31
MG osmotisch: 734 ± 35 (35 mg in THF)
IR : (in Chl) vgl. Abbildung p 25
NMR : (in $CDCl_3$, vgl. Abbildung p 28) 0.96 D [6Hz] und 0.92 D [6Hz] ($-CH-(C\underline{H}_3)_2$) / 1.32 D [7Hz] (N,N'-$CH-C\underline{H}_3$) / 1.39 S und 1.43 S ($-O-C(CH_3)_3$) / 2.54 Q und 3.22 Q ($-C\underline{H}_2$ von Prolin) / 3.07 D [7Hz] ($-C\underline{H}_2-C_6H_5$) / 3.9 ko (α-C<u>H</u> von Prolin) / 4.36 Q [7Hz] (N,N'-$C\underline{H}-CH_3$) / 4.2-4.8 ko (3 α-C<u>H</u>) / 6.74 D [8Hz] ($-N\underline{H}-$) / 7.2 ko (5 aromat. <u>H</u>, 1 N<u>H</u>-) / 1.5-2.4 ko (restliche C<u>H</u>)
MS : vgl. Abbildung p 38
CH_3CHO nach Hydrolyse [1] : 93 Proz. d. Th.
Totalhydrolyse: Pro 0.97, Leu 1.03, Glu 0.93, Phe 1.00

b) 500 mg Tetrapeptidester (6) werden nach Methode B mit 68 mg Acetaldehyd umgesetzt. Nach 8 h dampft man am Vak zum Sirup ein. Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chl-MeOH (1 Proz.) ergibt 410 mg Imidazolidinon (7) als farblosen Sirup.

$[\alpha]_D$: -41^o (c = 0.5, MeOH)
DC : wie unter a)
IR, NMR, MS identisch mit dem nach a) gewonnenen Produkt.

Titration: 12.4 mg (7) werden in 3 ml Dioxan gelöst, mit 3 ml Wasser verdünnt, 0.2 ml 2.5M KCl-Lg zugesetzt und mit 0.1N HCl auf einem Titrigraphen (RADIOMETER TTT) titriert. Die Titrationskurve zeigt ein schwaches Puffergebiet um pH = 3.5.

Acylierungsversuch: 10 mg (7) werden bei ZT mit 1 ml Ac_2O und

---

1) 5.80 mg (7) und 2 ml 0.1N Essigsäure in der Ampulle 1 h bei 110^oC erhitzt, in Eiswasser gekühlt und die Lösung nach Vorschrift p 104 destilliert.

1 ml Pyridin versetzt, nach 2 h am Vak unter zweimaliger Zugabe von Toluol eingedampft. Der sirupöse Rückstand ist nach DC und IR unverändertes Imidazolidinon (7).

Versuch zur Hydrogenolyse: 10 mg (7) und 1 mg Pd-Kohle werden in 2 ml Eisessig bei ZT, anschliessend bei 60°C mit Wasserstoff behandelt. Nach Abtrennung von Katalysator und Lgm bleibt das unveränderte Imidazolidinon (7) zurück (DC und IR).

Permethylierung: 10 mg (7) werden nach der Vorschrift p 102 methyliert. Der Rückstand des Chl-Extraktes enthält nur das quaternisierte Ammoniumjodid.

DC : d/langer Fleck am Start
gelb beim Besprühen mit KJO_3 (1-proz.) in 1N HCl

7.5 $\left|^{CHH}_{Pro}\right|$-Leu-Glu($OBu^t$)-Phe-$OBu^t$ (8), $C_{34}H_{52}O_7N_4$, MG 628.8

a) 100 mg Tetrapeptidester (6) werden nach Methode A in MeOH umgesetzt und nach 4 h wird von Katalysator und Lgm abgetrennt. Bei der Säulenchromatographie an Kieselgel können mit 200 ml Chl, 200 ml Chl-EtOH (1 Proz.) und 400 ml Chl-EtOH (2 Proz.) zuerst 18 mg N,N'-Aethylidenderivat (7), dann 70 mg N,N'-Methylenderivat (8) eluiert werden.

Smp : 138-139°C (aus MeOH-Wasser)
$[\alpha]_D$: -23° (0.4, MeOH)
DC : a/0.60, b/0.75, d/0.16
IR : (in Chl) 3400*, 3330*, 2960, 1730, 1680, 1615?, 1505*, 1440, 1380, 1160 (* Absorption geringer im Vgl. zu (6).)
NMR : (in $CDCl_3$), 0.96 D [6Hz] und 0.92 D [6Hz] ($-CH(C\underline{H}_3)_2$/ 1.39 S und 1.43 S ($-O-C(C\underline{H}_3)_3$ / 2.54 Q [5Hz] und 3.07 Q [5Hz] ($-CH_2$ von Prolin) / 3.07 D [7Hz] ($-C\underline{H}_2-C_6H_5$) / 3.76 ko (α-CH von Prolin) / 4.13 D [9Hz] und

4.60 D [9Hz] (N,N'-$C\underline{H}_2$) / 4.2-4.8 ko (3 α-C$\underline{H}$) / 6.8 ko (2 N$\underline{H}$-) / 7.2 ko (5 aromat. $\underline{H}$)

MS : M^+ = 628 m/e (vgl. Daten p 41)

Totalhydrolyse: Pro 0.96, Leu 1.08, Glu 0.94, Phe 1.00

b) 200 mg Tetrapeptidester (6) werden mit 0.050 ml Formalin (38-proz., entsprechend 20 mg Formaldehyd) in MeOH 2 h auf 50°C erwärmt, die Lösung filtriert und am Vak eingedampft. Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chl-EtOH (1 Proz.) ergibt 184 mg Imidazolidinon (8).

Smp : 138-139°C (aus MeOH-Wasser)

$[\alpha]_D$: -24° (c = 0.4, MeOH)

DC, IR, NMR wie unter a)

Versuche zur Hydrolyse: Kochen von 10 mg (8) in 2 ml Wasser oder in 2 ml Wasser-EtOH 1:1 während 2 h lässt das Imidazolidinon unverändert.

8. Versuche zur Synthese von nichtterminalen N,N'-Alkyliden-derivaten

8.1 Versuche zur Acylierung von H-Val-CHR-His-Pro-Phe-OMe (5a,b) (R=CH_3)

- Mit Essigsäureanhydrid:

a) 10 mg Imidazolidinon (5a,b) werden in 2 ml MeOH gelöst und bei ZT mit 0.5 ml Ac_2O versetzt. Nach 3 h dampft man am Vak zur Trockne ein.

b) 10 mg (5a,b) werden in 1 ml Pyridin gelöst und bei ZT mit 1 ml Ac_2O versetzt. Nach 3 h gibt man 5 ml Toluol zu und dampft am Vak zur Trockne ein.

DC : a/0.43-0.70 Gemisch unpolarer Produkte
Kein Edukt (5a,b) mehr.

(Eine zum Vergleich analog behandelte Probe Tetrapeptidester (4) zeitigt dasselbe Resultat, offensichtlich wird der Histidin-Rest teilweise acyliert.)

- Mit Chlorameisensäurebenzylester:

Man löst 30 mg (0.055 mMol) Imidazolidinon (5a,b) in 20 ml EtOH und 10 ml Wasser, kühlt auf $0^{\circ}C$, fügt 25 mg (0.62 mMol) MgO und 20 mg (0.12 mMol) Cbo-Chlorid zu, rührt 2 h, fügt weitere 20 mg Cbo-Chlorid zu, dampft am Vak auf ein Drittel ein und extrahiert drei Mal mit 20 ml Aether (Zentrifugieren). Den Aether-Extrakt trocknet man mit Natriumsulfat, filtriert und dampft ein. Das Chromatogramm lässt drei Produkte erkennen, welche durch Vergleich mit den Cbo-Derivaten des Tetrapeptidesters (4) zugeordnet werden können:

DC : a/0.71 Z-Val-His-Pro-Phe-OMe (A)

a/0.78 Z-Val-His(Im-Z)-Pro-Phe-OMe
(Kochen in Eisessig während 10 Min. spaltet Benzyloxycarbonyl am Imidazol ab und ergibt A [1].)

a/0.88 Wahrscheinlich H-Val-CHR-His(Im-Z)-Pro-Phe-OMe ($R=CH_3$)
(Kochen in Wasser während 30 Min. ergibt den Tetrapeptidester (4) zurück.)

---

1) Vgl. D.F.Elliott, D.Morris, Chimia 14, 373 (1960)
Abspaltung von Z am Imidazolring von Histidin.

8.2 Versuche zur Kupplung von Z-Val-Tyr-OH mit H-Val-$\underset{\text{CHR}}{\text{His}}$-Pro-Phe-OMe (5a,b) (R=$CH_3$)

- Mit Dicyclohexylcarbodiimid:

Man löst 10 mg (0.019 mMol) Imidazolidinon (5a,b), 7.4 mg (0.018 mMol) Z.Val-Tyr-OH·1 H_2O (Smp = 92°C, $[\alpha]_D$ = 25°, c = 1 in Pyridin) und 4.7 mg (0.023 mMol) DCCI (ALDRICH, redest.) in 1 ml Methylenchlorid bei ZT. Nach 43 h im Dunkeln können 3.6 mg Dicyclohexylharnstoff abfiltriert werden (Smp = 216-218°C). DC des Filtrats zeigt das Imidazolidinon (5a,b) unverändert, im weiteren DCCI (a/0.81, IRH-positiv), sowie ein Produkt (a/0.75, PR-gelb), welches dem N-Acylharnstoff oder dem symmetr. Anhydrid $(Z\text{-Val-Tyr})_2O$ entsprechen könnte.

- Mit Carbonyldiimidazol:

Man löst 7.4 mg (0.018 mMol) Z-Val-Tyr-OH·1 H_2O in 1 ml THF abs., fügt 6 mg (0.037 mMol) DCI und nach 30 Min. bei ZT 10 mg (0.019 mMol) Imidazolidinon (5a,b) zu. DC nach 60 h bei ZT zeigt Z-Val-Tyr-OH und Imidazolidinon (5a,b) unverändert, sowie Imidazol (a/0.29).

- Mit Chlorameisensäure-isobutylester:

Man löst 7.4 mg (0.018 mMol) Z-Val-Tyr-OH·1 H_2O und 1.8 mg = 2 µl (0.018 mMol) N-Methyl-Morpholin in 1 ml THF abs. und kühlt auf -20°C, fügt dazu 4.9 mg = 4.7 µl (0.036) CAIE und nach 30 Min. 10 mg (0.019 mMol) Imidazolidinon (5a,b). Nach 18 h bei -20°C zerstört man den Anhydrid-Ueberschuss bei 0°C durch Zutropfen von $KHCO_3$-Lg (22 g/100 ml) bis zum pH ca. 7, rührt 30 Min. bei ZT, nimmt in 10 ml Essigester auf, wäscht drei Mal mit 10 ml Wasser, trocknet den Essigester-Extrakt und dampft am Vak ein. Der Rückstand (18 mg) enthält ein unpolares Produkt (a/0.80, PR-gelb), welches nicht mit authentischem

Z-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (a/0.65) identisch ist, sowie Spuren der Edukte.

(Wird in obiger Vorschrift anstelle des Imidazolidinons (5a,b) der Tetrapeptidester (4) eingesetzt, so isoliert man ein ähnliches Produkt (a/0.80) anstelle des zu erwartenden Z-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-OMe (a/0.65).)

9. Anhang

9.1 Acetaldehyd und Formaldehyd aus NEt_3 und MeOH, resp. EtOH mit Pd-Kohle und Luftsauerstoff

a) Eine Druckflasche (500 ml) enthaltend: 20 ml = 15.8 g (0.50 Mol) MeOH abs. p.a., 1 ml = 0.73 g (7.2 mMol) NEt_3 p.a., 100 mg Pd-Kohle (10-proz.) und ca. 480 ml Luft (ca. 4.5 mMol O_2), wird verschlossen im Wasserbad von 60°C mit einem Magnetrührstab gerührt. Nach 4 h kühlt man in Eiswasser, filtriert das gelb verfärbte Reaktionsgemisch vom Katalysator ab und füllt bis 25 ml auf. 1 ml des Filtrats werden mit 2 ml 2N Schwefelsäure versetzt, der Destillation (Vorschrift p 104) unterworfen und das Destillat (ca. 9 ml) bis 10 ml aufgefüllt.

0.25 ml des Destillats enthalten $0.985 \cdot 10^{-7}$ Mol Acetaldehyd (Bestimmung spektrophotometrisch nach p 104).
2.00 ml des Destillats enthalten $0.67 \cdot 10^{-6}$ Mol Formaldehyd (Bestimmung spektrophotometrisch nach p 105).

b) Dieselben Reaktionsbedingungen wie unter a), jedoch mit 20 ml (0.35 Mol) EtOH 95-proz. UVASOL, MERCK anstelle des MeOH ergeben 25 ml eines farblosen Filtrats. 1.00 ml des Filtrats werden genau wie unter a) destilliert und das Destillat bis 10 ml aufgefüllt.

0.1 ml des Destillats enthalten $1.64 \cdot 10^{-7}$ Mol Acetaldehyd.
5.00 ml des Destillats enthalten $0.29 \cdot 10^{-7}$ Mol Formaldehyd.

(Vgl. die Zusammenstellung der Resultate, Tabelle p 16.)

9.2 Acylierung und Permethylierung von Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t (6)

a) Man löst 50 mg Tetrapeptidester (6) in 4 ml MeOH und 1 ml Ac_2O bei ZT, dampft nach 4 h unter zweimaliger Zugabe von 3 ml MeOH ein und kristallisiert aus MeOH-Wasser.

Smp : 142-143°C
DC : d/0.20

b) 15 mg Ac-Pro-Leu-Glu(OBu^t)-Phe-OBu^t werden nach der Vorschrift p 102 permethyliert und aufgearbeitet. Der Rückstand (10 mg) des Chl-Extraktes wird durch präparative DC mit Fliessmittel d gereinigt. Mit Chl-MeOH (1:1) können 4.4 mg des acetylierten und permethylierten Tetrapeptidesters (4) eluiert werden.

DC : d/0.34
IR : (in Chl) 2980, 1720, 1630, 1440, 1400, 1360, 1160 cm^{-1} (keine N-H-Banden bei 3300, 3400, keine Amid II Bande bei 1500)
MS : Vgl. Abbildung p 36

ZUSAMMENFASSUNG

Das in der Einleitung vorweggenommene Resultat: - Bildung von 4-Imidazolidinonen aus Peptidestern und in situ gebildetem Acetaldehyd bei der unvorsichtigen Hydrogenolyse von Benzyloxycarbonyl-peptidestern - fusst auf sorgfältiger chromatographischer Isolierung der Produkte und konsequenter Untersuchung der neuen Substanzen mittels spektroskopischer Methoden (Orientierung durch IR, Beweis durch NMR und MS).

Die analytischen Schlussfolgerungen wurden durch Synthese der 4-Imidazolidinone und durch Rückbildung von Peptidester und Carbonylverbindung bei deren milden Hydrolyse bestätigt.

Analoge Peptidderivate aus Oxytocin und Aceton sind von d u V i g n e a u d entdeckt und bearbeitet worden, ohne dass dieser Autor die allgemeine Bedeutung der reversiblen Imidazolidinon-Entstehung für die Peptidchemie erörtert hätte. Unbeabsichtigte und unbemerkte Imidazolidinonbildung, bzw. Spaltung ist eine potentielle Fehlerquelle bei Peptidsynthesen, weil sie zu Fehlsequenzen führen kann.

Andererseits eröffnen sich aufgrund der besonderen, in dieser Arbeit abgehandelten, Eigenschaften der Imidazolidinone auch positive Perspektiven. Die Alkylidensubstitution am terminalen Amino- und benachbarten Peptidstickstoff hat, wie ausführlich dargelegt wird, Schutzgruppencharakter, und zwar sowohl im Sinne einer reversiblen Maskierung der Nucleophilie der Aminogruppe als auch im Sinne der Blockierung unerwünschter Reaktivität der beteiligten Amidgruppe.

Der Ausblick schliesst mit einer Diskussion über den zu erwartenden Einfluss nichtterminaler Imidazolidinonstrukturen auf

Konformation und Chemie von Peptiden; Ansätze zu ihrer Synthese werden beschrieben.

Zur Benennung und schematischen Formulierung der Imidazolidinone aus Peptiden wird eine rationale Erweiterung der Peptidnomenklatur vorgeschlagen.

LITERATURVERZEICHNIS

[1] R.Schwyzer, B.Iselin, H.Kappeler, B.Riniker, H.Zuber, Helv. 41, 1287 (1958)

[2] R.Schwyzer, P.Sieber, Helv. 49, 134 (1966)

[3] B.Riniker (CIBA AG, Basel), private Mitteilung

[4] A.Strecker, Liebigs Ann.Chem. 93, 370 (1855)

[5] K.Heyns, H.Paulsen, 'Newer Methods in Preparative Organic Chemistry', Vol. 2, 303, (Academic Press, New York 1963)

[6] W.G.Lloyd, J.Org.Chemistry 32, 2816 (1967)

[7] P.A.S.Smith, 'The Chemistry of Open Chain Organic Nitrogen Compounds', Vol. 1, 47 (Benjamin Inc., New York 1965)

[8] H.B.Henbest, A.Thomas, J.Chem.Soc. 1957, 3022

[9] E.F.Curragh, H.B.Henbest, A.Thomas, J.Chem.Soc. 1960, 3557

[10] H.B.Henbest, M.J.W.Stratford, J.Chem.Soc.(C) 1966, 995

[11] H.Shechter, S.S.Rawalay, J.Amer.Chem.Soc. 86, 1706 (1964)

[12] D.H.Rosenblatt, G.T.Davis, L.A.Hull, G.D.Forberg, J.Org. Chemistry 33, 1649 (1968)

[13] D.Buckley, S.Dunstan, H.B.Henbest, J.Chem.Soc. 1957, 4901

[14] H.B.Henbest, M.J.W.Stratford, J.Chem.Soc. 1964, 711

[15] S.Dunstan, H.B.Henbest, J.Chem.Soc. 1957, 4905

[16] J.F.Weiss, Inorg.Chemistry 3, 1344 (1964)

[17] R.A.Jerussi, M.R.McCormick, Chem.Communications 1969, 639

[18] A.Weissberger, 'Technique of Organic Chemistry', Vol. 7, 333 (Interscience Inc., New York, 2nd Ed. 1955)

[19] W.G.Lloyd, Patent, siehe Chem.Abstr. 70, 61623x

[20] W.G.Lloyd, Patent, siehe Chem.Abstr. 71, 49551k

[21] H.Wieland, F.Bergel, Liebigs Ann.Chem. 439, 196 (1925)

[22] E.C.Wagner, J.Org.Chem. 19, 1862 (1954)

[23] D.Wrinch, Nature 137, 411 (1935)

[24] D.Wrinch, 'The Chemical Aspects of the Structure of Small Peptides' (Munksgaard, Kopenhagen 1960)

[25] A.M.Shkrob, Yu.I.Krylova, V.K.Antonov, M.M.Shemyakin, Tetrah.Letters 1967, 2701

[26] M.Brenner, W.Hofer, Helv. 44, 1794 (1961)

[27] A.Prox, J.Schmid, H.Ottenheym, Liebigs Ann.Chem. 722, 179 (1969)

[28] J.T.Edward, E.F.Martlew, Chem.Ind. 1954, 193

[29] D.Wrinch, Nature 199, 564 (1963)

[30] D.S.Jones, G.W.Kenner, R.C.Sheppard, Experientia 19, 127 (1963)

[31] O.Jardetzky, C.D.Jardetzky, J.Biol.Chemistry 233, 383 (1958)

[32] F.A.Bovey, G.V.D.Tiers, J.Amer.Chem.Soc. 81, 2870 (1959)

[33] M.Mandel, J.Biol.Chemistry 240, 1586 (1965)

[34] J.E.Shield, Biochemistry 5, 1041 (1966)

[35] M.Goodman, E.E.Schmitt, D.A.Yphantis, J.Amer.Chem.Soc. 84, 1288 (1962)

[36] B.Bak, C.Dambmann, D.Nicolaisen, F.J.Pedersen, J.Molecular Spectroscopy 26, 78 (1968)

[37] C.C.McDonald, W.D.Philipps, J.Amer.Chem.Soc. 91, 1513 (1969)

[38] S.Pinchas, D.Ben-Ishai, J.Amer.Chem.Soc. 79, 4099 (1957)

[39] T.Miyazawa, J.Chem.Phys. 32, 1647 (1960)

[40] a)K.Blaha, J.Smolikova, A.Vitek, Coll.Cz.Chem.Comm. 31, 4296 (1966)
b)L.Mladenova-Orlinova, K.Blaha, J.Rudinger, Coll.Cz. Chem.Comm. 32, 4070 (1967)

[41] U.Zehavi, D.Ben-Ishai, J.Org.Chem. 26, 1097 (1961)

[42] V.J.Hruby, D.Yamashiro, V.du Vigneaud, J.Amer.Chem.Soc. 90, 7106 (1968)

[43] G.A.Hardcastle, D.A.Johnson, C.A.Panetta, J.Org.Chem. 31, 897 (1966)

[44] J.S.Cohen, R.I.Shrager, M.McNeel, A.N.Schechter, Nature 228, 642 (1970)

[45] W.A.Stewart, T.H.Siddall III, Chemical Review 70, 517 (1970)

[46] M.Frucht, A.H.Lewin, Tetrah.Letters 1970, 3707

[47] F.A.Bovey, Pure Appl.Chemistry 16, 417 (1968)

[48] M.Sheinblatt, J.Amer.Chem.Soc. 88, 2845 (1966)

[49] T.Wieland, H.Bende, Chem.Ber. 98, 504 (1965)

[50] B.Halpern, L.F.Chew, B.Weinstein, J.Amer.Chem.Soc. 89, 5051 (1967)

[51] B.Halpern, D.E.Nitecki, Tetrah.Letters 1967, 3075

[52] C.M.Deber, F.A.Bovey, J.P.Carver, E.R.Blout, J.Amer.Chem. Soc. 92, 6191 (1970)

[53] J.L.Dimicoli, M.Ptak, Tetrah.Letters 1970, 2013

[54] J.T.Edward, J.Lantos, Can.J.Chemistry 45, 1925 (1967)

[55] K.D.Kopple, M.Ohnishi, A.Go, J.Amer.Chem.Soc. 91, 4264 (1969)

[56] K.L.Agarwal, G.W.Kenner, R.C.Sheppard, J.Amer.Chem.Soc. 91, 3096 (1969)

[57] G.W.A.Milne, T.Axenrod, H.M.Fales, J.Amer.Chem.Soc. 92, 5170 (1970)

[58] R.T.Aplin, J.Eland, J.H.Jones, Org.Mass Spectrom. 2, 795 (1969)

[59] R.T.Aplin, J.H.Jones, B.Liberek, J.Chem.Soc.(C) 1968, 1011

[60] F.Weygand, H.Fessel, K.Sun Sun, Z.Naturforsch. 20b, 1169 (1965)

[61] A.A.Kiryushkin, Yu.A.Ovchinnikov, M.M.Shemyakin, V.N. Bochkarev, B.V.Rozinov, N.S.Wulfson, Tetrah.Letters 1966, 33

[62] D.W.Thomas, T.Ito, Tetrah. 25, 1985 (1969)

[63] D.W.Thomas, B.C.Das, S.D.Gero, E.Lederer, Biochem.Biophys.Res.Commun. 32, 199 (1968)

[64] G.W.A.Milne, A.A.Kiriushkin, Yu.A.Alakhov, V.Liskin, Yu.A. Ovchinnikov, Tetrah. 26, 299 (1970)

[65] F.F.Richards, W.T.Barnes, Nature 221, 1243 (1969)

[66] K.Heyns, H.F.Grützmacher, Fortschr.chem.Forsch. 6, 536 (1966)

[67] J.H.Jones, Quart.Rev. 22, 302 (1968)

[68] A.N.de Belder in 'Advances in Carbohydrate Chemistry', Vol. 20, 219 (M.L.Wolfrom, Ed. 1965)

[69] D.Yamashiro, H.L.Aanning, L.A.Branda, W.D.Cash, V.V.S. Murti, V.du Vigneaud, J.Amer.Chem.Soc. 90, 4141 (1968)

[70] K.Freter, J.C.Rabinowitz, B.Witkop, Liebigs Ann.Chem. 607, 174 (1957)

[71] J.T.Edward, E.F.Martlew, Chem.Ind. 1954, 193

[72] S.Berntsson, Anal.Chemistry 28, 1337 (1956)

[73] R.Preussmann, H.Hengy, D.Luebbe, H.von Hodenberg, Analyt. Chim.Acta 41, 497 (1968)

[74] R.L.Reeves in 'The Chemistry of the Carbonyl Group' p 608 ff (S.Patai, Ed., Interscience, London 1963)

[75] P.A.S.Smith 'The Chemistry of Open Chain Organic Nitrogen Compounds' p 168 (Benjamin Inc., New York 1965)

[76] Osamu Shimomura, Nippon Kagaku Zasshi 81, 1434 (1960); Chem.Abstr. 56, 7299h

[77] IUPAC 'Nomenclature of Organic Chemistry, Section A,B, 2nd Ed. 1957 (Butterworth, London 1966), Section C 1965 (Butterworth, London 1965)

[78] IUPAC-IUB J.Biol.Chemistry 241, 2491 (1966)

[79] D.H.Spackmann, W.H.Stein, S.Moore, Analyt.Chemistry 30, 1190 (1958)

[80] J.E.Shield, J.Amer.Chem.Soc. 90, 3549 (1968)

[81] P.Edman, G.Begg, Europ.J.Biochemistry 1, 80 (1967)

[82] H.Biltz, K.Seydel, Liebigs Ann.Chem. 391, 215 (1912)

[83] J.Stanek, Chem.Listy 45, 459 (1951)

[84] H.C.Carrington, C.H.Vasey, W.S.Waring, J.Chem.Soc. 1953, 3105

[85] P.G.Ferrini, A.Marxer, Helv. 46, 1207 (1963)

[86] F.Asinger, W.Schäfer, H.Kersten, H.Meisel, A.Saus, Mh. Chem. 98, 1832 (1967)

[87] A.C.Davis, A.L.Levy, J.Chem.Soc. 1951, 3479

[88] E.Schipper, E.Chinery, J.Org.Chemistry 26, 4480 (1961)

[89] W.Ried, W.von der Emden, Liebigs Ann.Chem. 661, 76 (1963)

[90] J.Brunken, G.Bach, Chem.Ber. 89, 1363 (1956)

[91] 'The Chemistry of Penicillin' p 160, 188 (Eds. T.J.J. Clarke, J.R.Johnson, R.Robinson, University Press, Oxford 1949)

[92] C.W.Bird, Tetrah. 22, 2489 (1966)

[93] Patent Japan 3095 (1967); Chem.Abstr. 66, 115707r

[94] Patent US 3 284 447; Chem.Abstr. 66, 28772q

[95] Patent Neth. 6 409 088; Chem.Abstr. 63, 2978h

[96] Yoshiro Ogata, Atsushi Kawasaki in 'The Chemistry of the Carbonyl Group', Vol. 2, p 1 (Ed. S.Patai, Interscience, London 1970)

[97] M.Levy, D.E.Silberman, J.Biol.Chem. 118, 723 (1937)

[98] R.G.Kallen, W.P.Jencks, J.Biol.Chem. 241, 5864 (1966)

[99] S.P.L.Sörensen, Biochem.Z. 7, 45 (1907)

[100] H.Fraenkel-Conrat, H.S.Olcott, J.Amer.Chem.Soc. 70, 2673 (1948)

[101] M.M.Sprung, Chem.Rev. 26, 297 (1940)

[102] E.H.Cordes, W.P.Jencks, J.Amer.Chem.Soc. 85, 2843 (1963)

[103] H.G.Reiber, T.D.Stewart, J.Amer.Chem.Soc. 62, 3026 (1940)

[104] O.Gerngross, A.Olcay, Chem.Ber. 96, 2550 (1963)

[105] J.C.Sheehan, V.J.Grenda, J.Amer.Chem.Soc. 84, 2417 (1962)

[106] T.C.Bruice, R.M.Trapping, J.Amer.Chem.Soc. 85, 1480 (1963)

[107] D.J.Cram, R.D.Guthrie, J.Amer.Chem.Soc. 87, 397 (1965)

[108] P.Y.Sollenberger, R.B.Martin, J.Amer.Chem.Soc. 92, 4261 (1970)

[109] B.Halpern, A.D.Cross, Chem.Ind. 1965, 1183

[110] E.Havinga, E.L.T.M.Spitzer, Rec.Trav.chim.Pays-Bas 76, 173 (1957)

[111] E.L.T.M.Spitzer, E.Havinga, Rec.Trav.chim.Pays-Bas 76, 523 (1957)

[112] E.D.Bergmann, W.Taub, J.Chem.Soc. 1951, 2673

[113] T.Wieland, K.Dose, Angew.Chem. 66, 781 (1954)

[114] D.Ben-Ishai, J.Amer.Chem.Soc. 79, 5736 (1957)

[115] F.Micheel, W.Meckstroth, Chem.Ber. 92, 1675 (1959)

[116] D.French, J.T.Edsall in 'Advances in Protein Chemistry', Vol. 6, 278 (Eds. M.L.Anson, J.T.Edsall, Academic Press, New York 1945)

[117] P.A.S.Smith, 'The Chemistry of Open-Chain Organic Nitrogen Compounds' p 21, 300 (Benjamin Inc., New York 1965)

[118] H.Burckhalter, J.N.Wells, W.J.Mayer, Tetrah.Letters 1964, 1353

[119] H.Fraenkel-Conrat, H.S.Olcott, J.Biol.Chemistry 174, 827 (1948)

[120] J.Hine, B.C.Menon, J.Mulders, R.L.Flachskam, J.Org.Chem. 34, 4083 (1969)

[121] A.Einhorn, Liebigs Ann.Chem. 361, 113 (1908)

[122] Hellmann-Opitz,'α-Aminoalkylierung', p 64 (Verlag Chemie, Weinheim 1960)

[123] L.J.Saidel, J.S.Satzman, W.H.Elfring, Nature 207, 169 (1965)

[124] E.J.Cohn, J.T.Edsall,'Proteins, Amino Acids and Peptides' (Reinhold, New York 1943)

[125] D.D.Perrin, 'Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution' (Butterworth, London 1965)

[126] J.Clark, D.D.Perrin, Quart.Rev. 18, 295 (1964)

[127] H.K.Hall, J.Amer.Chem.Soc. 79, 5441 (1957)

[128] M.A.Tilak, Tetrah.Letters 1970, 849

[129] G.W.Anderson, R.Paul, J.Amer.Chem.Soc. 80, 4423 (1958)

[130] J.C.Sheehan, G.P.Hess, J.Amer.Chem.Soc. 77, 1067 (1955)

[131] D.Yamashiro, V.du Vigneaud, J.Amer.Chem.Soc. 90, 487 (1968)

[132] J.Rudinger in 'Peptides, Proceedings of the Fifth European Symposium', p 155 (Ed. G.T.Young, Pergamon, London 1963)

[133] H.Takashima, V.du Vigneaud, J.Amer.Chem.Soc. 92, 2501 (1970)

[134] R.Schwyzer, B.Riniker, H.Kappeler, Helv. 46, 1541 (1963)

[135] G.Losse, W.Zürcher, Liebigs Ann.Chem. 636, 140 (1960)

[136] H.Biltz, K.Seydel, E.Hamburger, Liebigs Ann.Chem. 428, 198 (1922)

[137] E.Stahl, 'Dünnschichtchromatographie' (Springer Verlag, 2. Aufl. 1966)

[138] V.J.Hruby, V.du Vigneaud, J.Amer.Chem.Soc. 91, 3624 (1969)

[139] P.Quitt in 'Peptides, Proceedings of the Fifth European Symposium', p 165 (Ed. G.T.Young, Pergamon, London 1963)

[140] E.Dane, R.Heiss, H.Schäfer, Angew.Chem. 71, 339 (1959)

[141] J.J.Wren, J.Chromat. 12, 32 (1963)

[142] F.Weygand, W.Steglich, J.Bjamason, Chem.Ber. 101, 3642 (1968)

[143] W.Koenig, R.Geiger, Chem.Ber. 103, 2041 (1970)

[144] R.L.Huegenin, R.A.Boissonnas, Helv. 44, 213 (1961)

[145] K.Jost, J.Rudinger, F.Sorm, Coll.Cz.Chem.Commun. 26, 2496 (1961)

[146] M.Bovarnick, H.T.Clarke, J.Amer.Chem.Soc. 60, 2426 (1938)

LEBENSLAUF

Als Sohn des Alphonse Cardinaux (gest. 1953) aus Châtel-St. Denis (FR) und der Louise, geb. Kretz, wurde ich François Joseph Cardinaux am 16. November 1943 in Reinach (BL) geboren.

In Reinach besuchte ich die Primar- und Realschule und anschliessend die Oberstufe des Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Basel, wo ich 1963 die Maturitätsprüfung (c) bestand. Im Sommersemester 1962 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und belegte Chemie als Hauptfach, Mathematik, Physik, physikalische Chemie und Pharmakologie als Nebenfächer. Im November 1964 bestand ich das erste Vordiplom (anorganische Chemie, organische Chemie, Mathematik), im Oktober 1965 das zweite Vordiplom (Physik, Pharmakologie) und im November 1967 das Diplomexamen (anorganische Chemie, organische Chemie, physikalische Chemie). Die Arbeit an der vorliegenden Disseration begann ich unter der Leitung von Prof. M. Brenner im Dezember 1967.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika der folgenden Dozenten:

P.Baertschi, H.Balli, M.Brenner, H.Buess, K.Bucher, P.Buchner, H.Erlenmeyer, A.Ernst, S.Fallab, C.Grob, P.Huber, P.Läuger, A.Marxer, B.Prijs, P.Scherrer, P.Schiess, H.Seiler, Ch.Tamm, M.Thürkauf, R.Witzinger.

Während meiner ganzen Studienzeit durfte ich ein grosszügiges Stipendium des Kantons Baselland entgegennehmen, wofür ich an dieser Stelle meinen Dank ausspreche.